

**UNTERSUCHUNGEN ZUR RESORPTION UND
METABOLISIERUNG VON N-NITROSOBENZYLMETHYLAMIN
AM MODELL DES ISOLIERT PERFUNDIERTEN
RATTENDARMS**

JOHANNES SCHULZE

1987

Disbui. München.

1987



10
and the
1000

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

Untersuchungen zur Resorption und Metabolisierung
von N-Nitrosobenzylmethylamin am Modell des
isoliert perfundierten Rattendarms

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Schulze

aus

Alfhausen

1987

**Aus dem Walther-Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der medizinischen Fakultät der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. W. Forth)**

**Untersuchungen zur Resorption und Metabolisierung
von N-Nitrosobenzylmethylamin am Modell des
isoliert perfundierten Rattendarms**

Inaugural-Dissertation

**Erwerb des Doktorgrades der Medizin
Bestimmung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

von

Johannes Schulze

aus

Alfhausen

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Prof. Dr. H. Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. U. Jehn

Prof. Dr. R. Scholz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. G. Strugala

Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 10. Dezember 1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungen.....	5
1.	Einleitung.....	6
2.	Material.....	9
2.1	Geräte.....	9
2.2	Reagenzien.....	10
3.	Methoden.....	11
3.1	Versuchstiere.....	11
3.1.1	Induktion.....	11
3.2	Perfusion von Rattendarmsegmenten.....	12
3.3	Analytische Methoden.....	15
	Glucosebestimmung.....	15
	Elektrolytbestimmung.....	15
	Radioaktivitätsmessungen.....	15
	Bestimmung proteingebundener Radioaktivität.....	16
	Bestimmung DNA-gebundener Radioaktivität.....	17
	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	18
	Flüssigkeitschromatographie.....	19
	Dünnschichtchromatographie.....	20
	Bestimmung von Formaldehyd.....	21
	Enzymatische Spaltung von Glukuroniden und Galaktosiden.....	22
4.	Ergebnisse.....	23
4.1	Durchtritt von NBzMA durch Rattendarmsegmente...	23
4.1.1	Durchtritt von NBzMA durch Darmsegmente nicht vorbehandelter Ratten.....	23
	Jejunum.....	23
	Ileum.....	26
4.1.2	Metabolisierung von NBzMA.....	27
4.1.2.1	Metabolisierung von NBzMA durch Darmseg- mente nicht induzierter Ratten.....	27
	Jejunum.....	27
	Ileum.....	27
4.1.2.2	Metabolisierung von NBzMA durch Darmseg- mente ölvorbehandelter Ratten.....	28
	Jejunum.....	28
	Ileum.....	30
4.2	Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen.....	32
4.2.1	Induktion mit 3-Methylcholanthren.....	32
	Jejunum.....	32
	Ileum.....	33

4.2.2	Induktion mit Phenobarbital.....	35
	Jejunum.....	35
	Ileum.....	37
4.2.3	Hemmung des NBzMA-Stoffwechsels.....	39
	Jejunum.....	39
	Ileum.....	40
4.3	Konzentrationsabhängigkeit des NBzMA-Metabolismus.....	40
	Jejunum.....	40
	Ileum.....	44
4.4	Versuche zur Charakterisierung der Metabolitenfraktion.....	48
4.4.1	Bildung von CO ₂	48
	Jejunum.....	49
	Ileum.....	49
4.4.2	Nachweis nicht konjugierter Metaboliten.....	50
	Messung von Formaldehyd.....	51
	Messung von Ameisensäure.....	51
	Messung von Benzylmethylamin.....	52
4.4.3	Nachweis von konjugierten Metaboliten.....	52
	durch HPLC-Chromatographie.....	52
	durch Dünnschichtchromatographie.....	54
	Enzymatische Spaltung durch Glukuronidase und Galaktosidase.....	55
4.4.4	Nachweis von Metaboliten mit intakter Nitrosfunktion.....	59
4.4.5	Nachweis von gebundener Radioaktivität.....	61
	Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität.....	61
	Bestimmung der DNA-gebundenen Radioaktivität.....	62
5.	Diskussion.....	63
5.1	Methodisch-kritische Vorbemerkungen.....	63
5.2	Aufnahme von NBzMA durch Rattendarmsegmente.....	64
5.3	NBzMA-Metabolismus.....	67
5.4	Zur Induzierbarkeit des NBzMA-Stoffwechsels.....	73
6.	Zusammenfassung.....	77
7.	Tabellenanhang.....	79
8.	Literatur.....	87

Abkürzungen

3-MC	3-Methylcholanthren
NBzMA	N-Nitrosobenzylmethylamin
PB	Phenobarbital
RA	Radioaktivität
SK&F 525 A	Proadifen = Diethylaminoethyl-2,2-diphenylvalerat-hydrochlorid
S/M-Quotient	Serosa-Mucosa-Quotient
TCA	Trichloressigsäure

1. Einleitung

Nitrosamine bilden eine große Gruppe toxischer und kanzerogener Substanzen. Sie werden während einer Vielzahl technischer Prozesse gebildet (Herstellung und Verarbeitung von Gummiprodukten, Pestiziden, Detergentien usw.), entstehen aber auch in Lebensmitteln (Pökeln) sowie bei Verbrennungsprozessen (Tabakrauch) (Preussmann, 1984, Miller et al., 1984). Neben der Zufuhr exogen gebildeter Nitrosamine besteht auch die Möglichkeit der Nitrosaminbildung aus Nitrit und sekundären Aminen, insbesondere unter den sauren Bedingungen des Magenmilieus (Preussmann, 1984, Belander et al., 1985, Ji et al., 1986).

Die meisten bisher untersuchten Nitrosamine zeigen bei höheren Konzentrationen Tumorentwicklung in mehreren Organen. Daneben wird bei niedrigen Konzentrationen häufig eine stark ausgeprägte Organspezifität mit Tumorbildung in nur einem oder wenigen Organen beobachtet (Druckrey et al., 1967, Preussmann und Stewart, 1984).

Das Ösophaguskarzinom des Menschen tritt regional gehäuft auf. Extrem häufig ist es in Linxian in der Volksrepublik China (25 mal häufiger als in Regionen mit niedriger Inzidenz), in Puerto Rico (8 mal häufiger) und im Nordost-Iran (Lu et al., 1984); Endemiegebiete in Europa sind Schweden sowie die Bretagne und die Normandie in Frankreich (Larsson et al., 1975). Besonders in der VR China und im Iran zeichnet sich das Auftreten von Ösophaguskarzinomen durch starke Variation der Tumorfrequenz über kurze Entfernungen aus, was den Verdacht auf eine exogene Noxe nahelegt.

Als Ursache für die Häufung von Ösophaguskarzinomen in diesen Inzidenzgebieten werden bestimmte Ernährungsgewohnheiten angeschuldigt, wie die Kombination von Eisenmangel und hohem Alkoholkonsum in Schweden. Für diese Ernährungsweise ist im Tierversuch eine erhöhte DNA-Methylierung der Ösophagus-DNA als Hinweis auf eine Tumorentstehung nachgewiesen worden (Larsson et al., 1975,

Tabelle 1

Tumorinduktion in Labortieren durch NBzMA

(nach Preussmann und Stewart, 1984, und Marrett et al., 1986)

Tierart	Applikation	Tumorlokalisation
Maus	peroral	Lunge, Magen
Maus	subcutan	Ösophagus, Vormagen
Ratte	peroral	Ösophagus, Magen, Pharynx
Wüstenspringmaus	?	keine Tumorbildung innerhalb von zwei Jahren
syrische Hamster	?	kein sicherer Tumornachweis wegen zu hoher akuter Toxizität
Kaninchen	?	Ösophagus

Kouros et al., 1983, Schragar et al., 1986). Andererseits kann es auch zu einer erhöhten Ösophaguskarzinom-Inzidenz durch Kontamination der Nahrungsmittel mit einem Ösophaguskarzinogen wie N-Nitrosobenzylmethylamin (NBzMA) kommen. Diese Substanz konnte neben einigen anderen Nitrosaminen in Linxian in der Nahrung nachgewiesen werden (Lu et al., 1984, Li et al., 1985, Cheng und Li, 1985).

Im Tierversuch zeigt N-Nitrosobenzylmethylamin (NBzMA) neben einer hohen akuten Toxizität ($LD_{50} = 18 \text{ mg/kg}$ Körpergewicht) (Preussmann und Stewart, 1984) eine stark ausgeprägte Organotropie für den Ösophagus. Ferner werden vereinzelt Tumoren des Vor-

magens und des Pharynx beobachtet. Die bisher beobachteten Tumoralokalisationen im Tierversuch sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Bisherige Forschungen über NBzMA beschränken sich auf die in vivo-Untersuchung der kanzerogenen Potenz und auf die Bestimmung der DNA-Methylierung. Untersuchungen zur Aufnahme des NBzMA durch den Darm sind noch nicht durchgeführt worden. Auch der Metabolismus des NBzMA durch den Darm ist noch nicht beachtet worden, obwohl der Darm für viele Xenobiotica ein sehr stoffwechselaktives Organ ist (Pang und Gillette, 1978).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, am Beispiel des Rattendarms einen Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, wie NBzMA in den Organismus aufgenommen wird. Des weiteren war zu prüfen, inwieweit während der Resorption, also präsystemisch, NBzMA durch den Darm verstoffwechselt wird und welche Metaboliten dabei gebildet werden. In diesem Zusammenhang muß auch der Einfluß der Vorbehandlung mit Stoffwechselinduktoren wie Phenobarbital und 3-Methylcholanthren auf die Aufnahme und den Metabolismus von NBzMA charakterisiert werden. Die Untersuchungen hierzu wurden in vitro mit Hilfe der Perfusion von Darmsegmenten nach Fisher und Parsons (1949) durchgeführt.



2. Material

2.1 Geräte

Ganzglas-Perfusionsapparaturen, Fa. Kuglstatte, Garching

UV/VIS-Photometer, Fa. Eppendorf, Hamburg

Flammenphotometer, Fa. Eppendorf, Hamburg

Flüssigkeitsszintillationszähler, Fa. LKB, München

Standzentrifuge, Fa. Heraeus, Frankfurt

Microfuge, Fa. Eppendorf, Hamburg

HPLC-Pumpe, Fa. Gynkote, München

HPLC-Durchfluß-Radioaktivitätsdetektor, Fa. Berthold, München

Auswertecomputer Apple II+, Fa. Isomess, Straubenhardt

HPLC-Trennsäulen, C 18, ODS 5 μ , 12,5 cm x 4,6 mm

HPLC-Vorsäulen, C 18, ODS 30 μ , 0,5 cm x 4,6 mm

HPLC-Probenaufgabeschleife 1 ml Volumen, alle Fa. Gynkote, München

C 18-Bond Elut-Kartuschen, Fa. Analytichem, Harbor City, USA

Auswerteprogramm Multiplan, Fa. Microsoft GmbH, Taufkirchen

Kieselgel F 60_{254nm} mit Konzentrierungszone, Fa. Merck, Darmstadt

Glashomogenisator nach Potter-Elvehjem, 5 ml, 10 ml, 15 ml, Fa. Bender und Hobein, München

2.2 Reagenzien

^{14}C -Methyl-NBzMA, Geschenk von Dr. Wiessler, Heidelberg

NBzMA, Geschenk von Dr. Wiessler, Heidelberg

β -Glukuronidase/Arylsulfatase, E.C. 3.2.1.31/3.1.6.1, aus *Helix pomatia*, Fa. Boehringer Mannheim

β -Glukuronidase, E.C. 3.2.1.31, aus *Escherichia coli*, Fa. Boehringer Mannheim

β -Galaktosidase, E.C. 3.2.1.23, aus *Escherichia coli*, Fa. Boehringer, Mannheim

Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2), Fa. Linde, München

Omni-Szintisol, Fa. Merck, Darmstadt

Carbosorb, Fa. Merck, Darmstadt

GOD-Perid-Glukosebestimmungskit, Fa. Boehringer Mannheim

Elektrolyt-Standardlösung für die Flammenphotometrie, Fa. Eppendorf, Hamburg

Lithium-Verdünnungslösung für die Flammenphotometrie, Fa. Eppendorf, Hamburg

Alle anderen Reagentien wurden von Fa. Bender und Hobein, München bezogen

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley-Ratten, mittleres Körpergewicht 180 - 250 g, aus der Süddeutschen Versuchstierfarm GmbH & Co KG (Tuttlingen). Sie wurden in einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 h gehalten und ad libitum gefüttert (Trockenfutter Alma H 1003, Fa. Botzenhardt KG, Kempten) und getränkt.

3.1.1. Induktion

Zur Prüfung der Frage, ob der NBzMA-Metabolismus durch Stoffwechselinduktoren beeinflusst wird, wurden Ratten mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren vorbehandelt.

Phenobarbital: Den Tieren wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ml/250 g Körpergewicht einer PB-Suspension (20 mg/ml Phenobarbital in Öl) intragastral mittels einer Schlundsonde verabreicht. Dies entsprach einer Dosis von 80 mg Phenobarbital/kg Körpergewicht. Als Kontrolle wurde 1 ml/250 g Körpergewicht des Lösungsmittels intragastral verabreicht.

Methylcholanthren: An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurde den Tieren je 1 ml/250 g Körpergewicht einer 3-MC-Suspension (12,5 mg 3-Methylcholanthren in Öl) intragastral verabreicht, entsprechend einer Dosis von 50 mg 3-MC/kg Körpergewicht. Als Kontrolle wurde ebenfalls 1 ml/250 g Körpergewicht des Lösungsmittels intragastral verabreicht.

Kontrollen: Zur Kontrolle auf Induktionseffekte, die durch das Lösungsmittel hervorgerufen werden, wurden den Ratten an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ml Öl pro 250 g Körpergewicht (Weizenkeimöl Mazola) mit einer Stahl-Schlundsonde intragastral verabreicht. Dieses entsprach der Menge, die die Tiere auch bei der Induktion mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren erhalten

haben. Zusätzlich wurden Versuche mit Ratten durchgeführt, denen vor Versuchsbeginn nichts verabreicht worden war. Die Versuchsdurchführung erfolgte in allen Fällen am Morgen nach der letzten Gabe von Öl bzw. Induktionsmittel.

3.2 Perfusion von Rattendarmsegmenten

Verwendete Lösungen:

a) Tyrode-Lösung:	136,9 mmol/l NaCl
	2,7 mmol/l KCl
	11,9 mmol/l NaHCO ₃
	3,0 mmol/l NaH ₂ PO ₄
	13,0 mmol/l Glucose-1-hydrat
	1,4 mmol/l CaCl ₂
	0,5 mmol/l MgCl ₂

der pH der Lösung betrug etwa 8,5; nach der Begasung mit Carbogen stellte er sich auf etwa 7,2 ein

b) Citronensäurepuffer	100 mmol/l Citronensäure
	200 mmol/l Na ₂ HPO ₄

der pH-Wert der Lösung betrug etwa pH 2

c) GAU-Puffer:	6,8 mmol/l NH ₄ CO ₂ NH ₂
	14,6 mmol/l KH ₂ PO ₄

pH-Wert 6,5 - 7 ohne weitere Einstellung

Die Perfusionsexperimente wurden nach der von Fisher und Parsons (1949) beschriebenen Methodik in einer modifizierten Apparatur durchgeführt (Richter und Strugala, 1985; siehe Abbildung 1). Die Entnahme von Jejunum- und Ileumsegmenten erfolgte nach 18-stündigem Nahrungsentzug in Ethernarkose.

Zur Entnahme der Darmsegmente wurde in Ethernarkose die Flexura duodenojejunalis freipräpariert und der Darm eröffnet. Das Jeju-

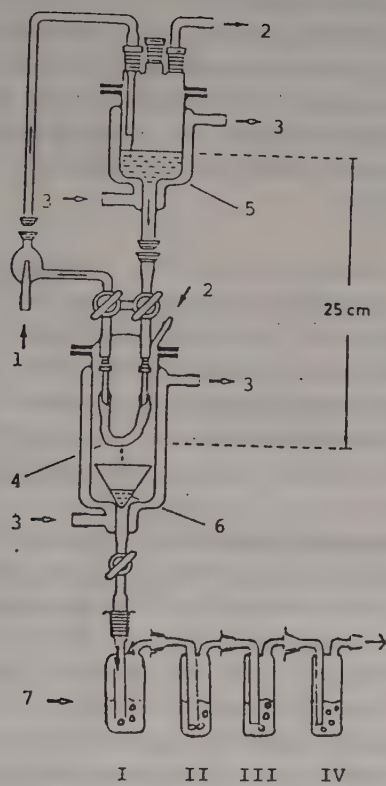
Abbildung 1

Ganzglasperfusionsapparatur

modifiziert nach Richter und Strugala, 1985.

Die mit Zahlen bezeichneten Apparaturteile entsprechen den folgenden Ein- und Ausgängen:

- 1) Zufuhr von Carbogen und Transport des Perfusionsmediums vom Darmsegment zum oberen Reservoir
- 2) Überleitung des Gasstromes aus der oberen in die untere Kammer
- 3) Ein- und Austritt des Thermostatwassers für die obere und untere Kammer
- 4) eingehängtes Darmsegment; Perfusionsrichtung von rechts nach links
- 5) Perfusat in der oberen Kammer, etwa 50 ml
- 6) Resorbat in einem Spitzglas in der unteren Kammer
- 7) Waschflaschen zur Absorption flüchtiger Radioaktivität
 - I) Butanol-Waschflasche
 - II) Butanol-Waschflasche
 - III) Carbosorb-Waschflasche
 - IV) wassergefüllte Waschflaschealle Waschflaschen waren mit 10 ml der angegebenen Flüssigkeit gefüllt



num wurde in eine Glaskanüle eingebunden, etwa 8 - 12 cm des nach distal folgenden Dünndarms vorsichtig vom Mesenterium abgetrennt, eine zweite Glaskanüle eingebunden und das Darmsegment nach Spülen mit Kochsalzlösung in die Perfusionsapparatur eingehängt. Dieses Darmsegment wurde als Jejunum bezeichnet.

Anschließend wurde der ileozökale Übergang aufgesucht, die hieran nach proximal anschließenden 8 - 12 cm des Ileums präpariert und das Darmsegment in Glaskanülen eingebunden. Dieses Segment wurde als Ileum bezeichnet.

Die etwa 10 cm langen Darmsegmente wurden in die mit Tyrode-Lösung gefüllte, mit Carbogen begaste und auf 37°C temperierte Apparatur eingehängt und in Zirkulation gehalten. Nach Überprüfung der Darmsegmente auf Dichtigkeit wurde das in 1 ml Tyrode-Lösung gelöste NBzMA dem oberen Reservoir zugesetzt ($t = 0$ min). Nach 5 min Zirkulationsdauer wurden 100 μ l Tyrodelösung (Doppelprobe) zur Bestimmung der eingesetzten Radioaktivität entnommen.

Nach zwei Stunden Perfusionsdauer wurde der Flüssigkeitsstrom durch die Darmsegmente unterbrochen. Die Segmente wurden sofort entnommen, die innen enthaltene Flüssigkeit heraustropfen gelassen und die Länge gemessen. Das Volumen der sich im Spitzglas befindlichen Flüssigkeit, die als Resorbat bezeichnet wird, und der noch im oberen Reservoir befindlichen Flüssigkeit, (einschließlich der aus den Darmsegmenten gewonnenen Flüssigkeit) die als Perfusat bezeichnet wird, wurden gravimetrisch bestimmt.

Der Darm wurde gewogen, längs aufgeschnitten, anhaftende Feuchtigkeit abgetupft und das Feuchtgewicht des Gesamtdarms bestimmt. Die Mucosa wurde mit einem Objektträger vom Bindegewebe abgeschabt und das Gewicht von Mucosa und Bindegewebe bestimmt. Die Mucosa wurde mit dem vierfachen Volumen Citronensäurepuffer oder GAU-Puffer in einem Elvehjem-Potter homogenisiert, die erhaltene homogene Suspension wird als Mucosahomogenat bezeichnet. Das Bindegewebe wurde in 2 ml Tetraethylammoniumhydroxid durch 2 Stunden Inkubation bei 50°C solubilisiert (Strugala, 1984).

Von Perfusat, Resorbat, Mucosahomogenat und solubilisiertem Bindegewebe sowie aus allen Waschflaschen wurden Aliquote entnommen (jeweils Doppelproben) und die in diesen Fraktionen sowie die in den nach 5 min entnommenen Perfusatproben befindliche Radioaktivität bestimmt. Im Perfusat und Resorbat wurden zusätzlich die Konzentrationen von Glucose und den Elektrolyten Na^+ , K^+ und Ca^{++} , in einigen Experimenten die im Mucosahomogenat an DNA gebundene und die proteingebundene Radioaktivität gemessen.

3.3 Analytische Methoden

Glucosebestimmung

Die Bestimmung der Glucosekonzentration im Perfusat und Resorbat erfolgte mit einem photometrischen Test nach der GOD-Perid-Methode (Testkit der Fa. Boehringer, Mannheim). Die Extinktion der Testlösung wurde bei 578 nm gemessen (Eppendorf-Photometer, Absaugküvette); die Umrechnung der Extinktionen auf Konzentrationen erfolgte über die Bestimmung der Extinktion von Standardproben bekannten Glucosegehalts.

Elektrolytbestimmung

Die Konzentration an Na^+ , K^+ und Ca^{++} in Perfusat- und Resorbatproben wurden spektrophotometrisch (Eppendorf-Flammenphotometer) gemessen. Dazu wurden 50 μl des Perfusats bzw. Resorbats mit 4 ml Lithium-Verdünnungslösung gemischt. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte mit einem externen Standard.

Radioaktivitätsmessungen

Aliquote von Perfusat und Resorbat wurden entnommen (50 μl bis 1000 μl Volumen), mit 15 ml Szintillationslösung (Omni-Szintisol, Merck, Darmstadt) versetzt und 2 Stunden im Dunklen stehen gelassen. Die in den Waschflaschen enthaltenen Flüssigkeiten wurden in Szintillationsgefäßen gesammelt, die Waschflaschen mit 5 ml Szintillationslösung gewaschen und die Szintillationsgefäße auf 20 ml mit Szintillationslösung aufgefüllt. Hierbei wurde aus

den Butanol enthaltenden Waschflaschen (I und II) und der Carbo-sorb enthaltenden Waschflasche (III) nach der Zugabe von Szintillationsflüssigkeit eine klare Lösung erhalten, aus der Wasser enthaltenden Waschflasche (IV) ein opakes Gel. Alle Proben ergaben zuverlässige Radioaktivitätswerte, wie durch Zusatz von radioaktiven Standardproben bestätigt werden konnte.

500 μ l Mucosahomogenat bzw. solubilisiertes Bindegewebe wurden mit 15 ml Szintillationscocktail versetzt und intensiv geschüttelt. Nach 2 Stunden Stehenlassen im Dunkeln wurde der Radioaktivitätsgehalt gemessen.

Für die Berechnung der Wiederfindung wurden das Perfusat- und das Resorbatvolumen unter der Annahme einer Dichte von 1,0 kg/l aus dem Gewicht errechnet; die Volumina des Mucosahomogenats und des solubilisierten Bindegewebes wurden abgeschätzt durch Addition des zugesetzten Flüssigkeitsvolumens und des Gewebevolumens, das aus dem Gewicht unter der Annahme einer Dichte von 1,1 kg/l errechnet wurde.

Bestimmung proteingebundener Radioaktivität

Die homogenisierte Mucosa wurde mit einem Fünftel des Volumens an 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Das hierdurch ausgefällte Protein wurde abzentrifugiert (5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge) und die im klaren Überstand befindliche Radioaktivität bestimmt (entspricht der nicht proteingebundenen Radioaktivität im Mucosahomogenat). Das weiße Pellet wurde mit 1 ml Methanol versetzt, durch intensives Mischen auf dem Vortex-Mischer aufgeschlämmt und nach etwa 30 min das Pellet wie oben abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 3-5 mal wiederholt, bis nach Abzentrifugieren des Proteins im überstehenden Methanol keine Radioaktivität mehr gemessen werden konnte. Das Pellet wurde dann mit 500 μ l Tetraethylammoniumhydroxid versetzt und durch zwei Stunden Inkubation bei 50°C solubilisiert. Die in dieser Fraktion gemessene Radioaktivität wurde als proteingebundene Radioaktivität bezeichnet.

Bestimmung DNA-gebundener Radioaktivität

Zur Messung der an DNA gebundenen Radioaktivität wurde aus Sammelproben von Mucosahomogenaten die DNA in Anlehnung an die Methode von Marmur (1961) isoliert: die in Citronensäurepuffer homogenisierte Mucosa wurde mit einem Zehntel des Probevolumens an 25 %iger SDS-Lösung versetzt und 10 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurden die Proteine durch Zugabe von einem Zehntel des Volumens an 11,5 mol/l HClO₄ ausgefällt und abzentrifugiert.

Der klare Zentrifugationsüberstand wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Bei der anschließenden Zentrifugation (5000 Upm, 10 min) bildeten sich drei gut getrennte Fraktionen: der klare Überstand (= wäßrige Phase) mit der DNA wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Die klare Unterphase (= Chloroform) konnte anschließend dekantiert werden. Bei vorsichtigem Dekantieren blieb die feste Mittelphase (= Protein) an der Glaswand haften.

Die DNA wurde durch langsamen Zusatz von Ethanol zur wäßrigen Phase bis zur auftretenden Trübung gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in 1 ml 1 mol/l NaCl, 0,1 mol/l Trisatriumcitrat, pH 8, nochmals gelöst.

In allen erhaltenen Fraktionen wurde der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die nach abermaliger Lösung der gefällten DNA gemessene Radioaktivität wurde als DNA-gebundene Radioaktivität bezeichnet.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

NBzMA und Metaboliten von NBzMA in Perfusat-, Resorbat- und Mucosahomogenatproben wurden mittels C 18-reversed phase-HPLC gemessen. Perfusat- und Resorbatproben wurden ohne weitere Vorbehandlung analysiert, während Mucosahomogenatproben vor der Chromatographie enteiweißt wurden (Zugabe von einem Fünftel des Volumens an 10 %iger TCA, dann Zentrifugation für fünf Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge).

Bis zu 1000 μ l Probenvolumen wurden mit einer Schleife aufgegeben. Die Trennung erfolgte auf einer C 18-Shandon ODS 5 μ Säule (12,5 cm lang, 4,6 mm Innendurchmesser), der eine 0,5 cm lange Vorsäule gleicher Füllung und gleichen Durchmessers vorgeschaltet war.

Als Elutionsmittel dienten isokratische Gemische aus Methanol/GAU-Puffer mit einem Methanolanteil zwischen 10 und 70 %. Alternativ dazu wurde ein Gradientenprogramm verwendet, bei dem der Methanolanteil in 5 Minuten von 30 auf 70 % gesteigert wurde. Nach 5 Minuten wurde weitere 10 Minuten mit 70 % Methanol/30 % GAU-Puffer isokratisch eluiert. Die verwendeten Chromatographiebedingungen sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Mit Hilfe einer Durchflußzelle wurde die während der Elution erscheinende Radioaktivität gemessen. Die Auswertung der Radiochromatogramme und die Quantifizierung der Radioaktivitätspeaks erfolgte mit einem Apple II+-Computer und einem Meßprogramm der Firma Isomess, Straubenhardt. Zur Korrektur der Radiochromatogramme auf unspezifische Impulse ("Rauschen") wurde die Impulshäufigkeit während der Zeit 0 bis 2 min, d.h. vor dem Erscheinen des ersten Peaks, ermittelt und von den gemessenen Impulshäufigkeiten subtrahiert. Die Quantifizierung der Peaks erfolgte ausgehend von diesen korrigierten Chromatogrammen.

Flüssigkeitschromatographie

Für die Präparation größerer Mengen an Metaboliten wurde eine vereinfachte Trennmethode verwandt. Durch Extraktion mit C 18-Bond Elut-Kartuschen ließ sich NBzMA selektiv aus einer wäßrigen Lösung adsorbieren, während die Metaboliten im wäßrigen Eluat blieben. Dazu wurden bis zu 50 ml Perfusat auf C 18-Kartuschen (0,7 ml Volumen, 1 cm Höhe, 0,5 cm Durchmesser) aufgegeben, die mit Tyrodelösung vorgewaschen worden waren. Die aufgegebenen Proben wurden durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum eluiert, die Säulen mit 1 ml Tyrodelösung nachgewaschen und die Fraktionen vereinigt.

Das adsorbierte NBzMA wurde anschließend durch Aufgabe von 2 ml Methanol quantitativ eluiert. Durch Nachwaschen mit 1 ml Methanol und Messung der hierin enthaltenen Radioaktivität wurde geprüft, daß sich kein weiteres NBzMA von der Säule eluieren läßt, und die Säule durch Nachwaschen mit 2 ml Wasser und 2 ml Tyrodelösung regeneriert.

In gleicher Weise wurden Perfusat- und Resorbatproben an C 18-Bond Elut-Kartuschen mit schwach basischem Anionenaustauscherharz (quartäre Ammoniumgruppen) und schwach saurem Kationenaustauscherharz (mit Carboxymethylgruppen) chromatographiert. Nach der Elution der Probe im Wasserstrahlvakuum und Nachwaschen der Säule mit Wasser wurde das Anionenaustauscherharz mit 2 ml 0,1 mol/l-HCl gewaschen, um gebundene schwache Säuren zu eluieren. Das adsorbierte NBzMA wurde danach mit Methanol eluiert.

Das Kationenaustauscherharz wurde nach Elution der Probe im Wasserstrahlvakuum zur Elution von Basen mit 2 ml 0,1 mol/l NaOH gewaschen. Anschließend wurde das gebundene NBzMA wie oben mit 2 ml Methanol eluiert.

In allen Fällen wurde die Radioaktivität durch Szintillationsmessung für alle Fraktionen getrennt bestimmt. Die Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität betrug in allen Fällen 90 - 110 %.

Dünnschichtchromatographie

Die Metabolitenfraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgel F60-Platten, 10 x 10 cm Größe, mit 2,5 cm Konzentrierungszone, aufgetrennt (Fa. Merck, Darmstadt). Dazu wurden die in Tyrode gelösten Metaboliten oder die nach der Gefrier-trocknung in Wasser wiederaufgelösten Metaboliten bandförmig aufgetragen und das Wasser unter einem Infrarotstrahler verdampft. Die Platte wurde mit einem sauren Laufmittel (n-Butanol/90 % Essigsäure/Wasser 40:10:10) im Dunklen entwickelt; die Laufzeit betrug für 10 cm Wanderungsstrecke etwa 2 Stunden. Nach dem Verdunsten des Laufmittels wurden die unter UV-Licht (254 nm) aufleuchtenden Banden markiert. Das Kieselgel wurde mit einer Rasierklinge in 0,5 cm breiten Schichten vom Glas abgeschabt, in Szintillationsgefäßen gesammelt und die Metaboliten mit 1 ml Wasser vom Kieselgel über Nacht eluiert. Nach Zusatz von 10 ml Omni-Szintisol wurde der Radioaktivitätsgehalt in jeder Probe gemessen.

Vom Laufmittel wurde eine 1 ml-Probe entnommen und die in dieser Probe enthaltene Radioaktivität gemessen; diese Radioaktivität wurde als unter den Chromatographiebedingungen flüchtige Metaboliten bezeichnet.

Bestimmung von Formaldehyd

In Perfusatproben wurde Formaldehyd direkt mit einem kolorimetrischen Test nach Nash (1953) gemessen.

Reagenz: 2 mol/l Ammoniumacetat
 0,05 mol/l Essigsäure
 0,02 mol/l Acetylaceton

Die zu messende Probe (0,5 ml) wurde mit dem gleichen Volumen Reagenz versetzt und zur Entwicklung des gelb gefärbten Produkts Diacetyldihydroxylutidin 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Der gelbe Farbstoff wurde photometrisch gegen einen Reagentienleerwert bei 412 nm gemessen. Durch Bestimmung der Extinktionswerte von Standardproben mit bekanntem Formaldehydgehalt wurde eine Eichkurve aufgestellt und der Formaldehydgehalt der Proben anhand dieser Eichkurve berechnet.

In Resorbatproben war eine direkte Bestimmung des Formaldehydgehaltes mit dieser Methode nicht möglich, da die Eigenfarbe des Resorbats bei der Meßwellenlänge eine hohe, inkonstante Absorption ergab. Zum qualitativen Nachweis von Formaldehyd in Resorbaten wurden diese erhitzt. Das flüchtige Formaldehyd wurde in einer wassergefüllten, in Eis gekühlten Waschflasche absorbiert und Formaldehyd aus dieser Probe bestimmt.

Enzymatische Spaltung von Glukuroniden und Galaktosiden

Puffer: 20 mmol/l NaH_2PO_4
 100 mmol/l 2-Mercapto-Ethanol
 mit NaOH auf pH 6,9 eingestellt

5 ml einer Perfusatprobe oder 2 ml einer Resorbatprobe wurden durch 5-minütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad enteiweißt. Das Eiweiß wurde abzentrifugiert (5 min bei 3 000 Upm) und der klare Überstand auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an Puffer versetzt, 1000 Fishman-Einheiten Glukuronidase oder Galaktosidase zugesetzt und die gut geschüttelte Mischung 48 Stunden bei 46°C inkubiert. Die Enzyme wurden durch Zusatz von 1/10 des Volumens 10 %iger TCA ausgefällt, abzentrifugiert und 1 ml dieses Überstandes durch HPLC analysiert.

Für die Dünnschichtchromatographie wurde 1 ml eines Resorbats oder 500 µl in Tyrode wiederaufgelöste Metaboliten mit dem gleichen Volumen Puffer versetzt, Glukuronidase oder Galaktosidase zugesetzt und die Probe wie oben beschrieben behandelt. Der Inkubationsansatz wurde ohne Ausfällen der Enzyme auf die Dünnschichtplatten aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1. Durchtritt von NBzMA durch Rattendarmsegmente

Durch die Perfusion von Rattendarmsegmenten mit ^{14}C -NBzMA und die Bestimmung der Radioaktivität in allen Fraktionen (Perfusat, Resorbat, Mucosa, Bindegewebe und allen Waschflaschen) konnte geklärt werden, ob NBzMA während der Perfusion durch die Darmwand hindurchtritt. Die übergetretene Menge war dabei durch die im Resorbat wiedergefundene Radioaktivitätsmenge gegeben. Die Aufnahme von NBzMA in das Darmgewebe wurde durch die im Mucosahomogenat und im Bindegewebe wiedergefundene Radioaktivität angegeben.

4.1.1. Durchtritt von NBzMA durch Darmsegmente nicht vorbehandelter Ratten

a) Jejunum

Nach der Perfusion von Jejunumsegmenten nicht vorbehandelter Ratten (eingesetzte NBzMA-Konzentration $1 \mu\text{mol/l}$) fand sich der größte Teil der eingesetzten Radioaktivität im Perfusat wieder (ca. 75 %). Im Resorbat wurden etwa 5 % der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden. Im Darmgewebe selbst (Mucosa und Bindegewebe) wurden etwa 8 % wiedergefunden. Hiervon befand sich nur ein Viertel in der Mucosa, drei Viertel dagegen im Bindegewebe.

In den Waschflaschen I und II (Butanol enthaltende Waschflaschen) wurden 1 - 3 % der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden. Diese Menge entsprach auch der Substanzmenge, die bei der Leerpfusion ohne eingehängtes Darmsegment mit dem Gasstrom in die Waschflaschen überführt wurde (vergleiche die Ergebnisse der "Kontrollperfusion" in der Tabelle 2).

Tabelle 2

Verteilung von NBzMA in Jejunum- und Ileumsegmenten

Rattenjejunum- und Ileumsegmente wurden mit 1 μ mol/l NBzMA für zwei Stunden perfundiert. Die nach Beendigung des Versuches im Perfusat, Resorbat, Mucosahomogenat, Bindegewebe und den Waschflaschen insgesamt vorhandene Radioaktivitätsmenge (in 10^3 Bequerel) sowie die Konzentration der Radioaktivität im Perfusat, Resorbat, Mucosa und Bindegewebe (in 10^3 Bequerel/l) wurden bestimmt. Die an die Apparatur anhaftende Radioaktivität wurde mit Methanol ausgewaschen und unter "Apparatur" angeführt. Angegeben sind die bei einem typischen Versuch erhaltenen Meßergebnisse für Einzelperfusionen eines Jejunum- bzw. Ileumsegmentes sowie eine Kontrollperfusion.

	Jejunumperfusion		Ileumperfusion		Kontrollperfusion	
	Gesamt	Konzentration	Gesamt	Konzentration	Gesamt	Konzentration
eingesetzt	55 000 Bq	1 000 Bq/l	51 000 Bq	1 000 Bq/l	55 000 Bq	1 000 Bq/l
	= 100 %		= 100 %		= 100 %	
Perfusat	74 %	970 "	81 %	900 "	93,3 %	1 030 "
Resorbat	4,7 %	900 "	3,6 %	880 "	kein Resorbat	
Mucosa	1,3 %	970 "	1,4 %	990 "	keine Mucosa	
Bindegewebe	4,7 %	3 010 "	6,4 %	3 480 "	kein Bindegewebe	
Waschfl. I	3 %		1,4 %		3,3 %	
Waschfl. II	0,33 %		0,07 %		0,13 %	
Waschfl. III	0,53 %		0,07 %		< 0,06 %	
Waschfl. IV	0,06 %		< 0,06 %		< 0,06 %	
Apparatur	3,6 %		3,6 %		3,7 %	
Wiederfindung	50 100 Bq		50 700 Bq		55 300 Bq	
	= 93 %		= 98 %		= 100,5 %	

Die in der Waschflasche III (Methoxyethylamin = Carbosorb) sowie der Waschflasche IV (H_2O , zur Absorption von Methoxyethylamin) wiedergefundene Radioaktivitätsmenge wurde als CO_2 angesehen; hier fand sich noch 0,6 % der Radioaktivität wieder. Der höhere Radioaktivitätsgehalt der Waschflasche III gegenüber der Waschflasche II und das Fehlen von Radioaktivität in der Waschflasche III bei der Kontrollperfusion zeigten, daß in der Carbosorb-Waschflasche kein unspezifisch verschlepptes NBzMA mit erfaßt worden ist.

Die Wiederfindung der Radioaktivität betrug 90 - 100 % und war damit im Rahmen der Meßgenauigkeit vollständig. Die bei der Perfusion nicht vorbehandelter Jejunumsegmente erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt und den bei Kontrollperfusion sowie bei Ileumperfusionen erhaltenen Ergebnissen gegenübergestellt.

Betrachtet man die Radioaktivitätskonzentrationen in Resorbat und Perfusat bei Jejunumperfusionen, so fällt auf, daß mit $0,97 \times 10^3$ Bq/l im Perfusat und $0,90 \times 10^3$ Bq/l Radioaktivität im Resorbat etwa gleiche Konzentrationen gemessen wurden. Der S/M-Quotient für die Gesamtradioaktivität (Radioaktivität in Bq/l im Resorbat/Radioaktivität in Bq/l im Perfusat) betrug etwa 0,93, d.h. es erfolgte keine Anreicherung der Radioaktivität auf der serosalen Seite. Dagegen war in der Mucosa die Radioaktivität gegenüber dem Perfusat mit $1,1 \times 10^3$ Bq/g Gewebefeuchtgewicht leicht gegenüber dem Perfusat erhöht und im Bindegewebe mit $3,01 \times 10^3$ Bq/g Gewebefeuchtgewicht um den Faktor 3,1 stark erhöht. Eine mögliche Erklärung für diese Anreicherung ist die Lipophilie des NBzMA (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient 6; Richter, 1986).

b) Ileum

Qualitativ ähnliche Ergebnisse wie nach der Perfusion von Jejunumsegmenten wurden auch bei der Perfusion von Ileumsegmenten erhalten. Auch hier befand sich mit 81 % der größte Teil der eingesetzten Radioaktivität im Perfusat, während im Resorbat nur 3,6 % der Radioaktivität gemessen wurden. Mucosa und Bindegewebe enthielten mit 1,4 % bzw. 6,4 % der eingesetzten Radioaktivität gleich große NBzMA-Mengen wie bei den Jejunumsegmenten.

Im Gegensatz zu den beim Jejunum erhaltenen Ergebnissen ließ sich in der Carbosorb-Waschflasche nach der Perfusion von Ileumsegmenten keine Radioaktivität nachweisen. In den Butanol-Waschflaschen war dagegen eine gleich große Radioaktivitätsmenge wie bei der Jejunumperfusion wiedergefunden worden.

Auch im Ileum wurde mit 98 % die gesamte eingesetzte Radioaktivität wiedergefunden.

Bei der Perfusion von Jejunum- und Ileumsegmenten wurde radioaktiv markiertes NBzMA in allen Fraktionen wiedergefunden. Dabei war entsprechend dem Verhältnis der Flüssigkeitsvolumina in Perfusat und Resorbat der größte Teil des NBzMA im Perfusat enthalten; im Resorbat wurden nur wenige Prozent der Radioaktivität gefunden. Es erfolgte keine Anreicherung der Radioaktivität auf der Serosaseite, die Konzentration war im Resorbat etwas geringer als im Perfusat. Daneben wurde NBzMA wegen seiner Lipophilie auch ins Gewebe aufgenommen und reicherte sich dort gegenüber dem Perfusat in der Mucosa und stärker im Bindegewebe an. Ein geringer Anteil des NBzMA wurde mit dem Gasstrom aus dem Perfusat verschleppt und in den Waschflaschen I und II wiedergefunden.

4.1.2. Metabolisierung von NBzMA

4.1.2.1 Metabolisierung von NBzMA durch Darmsegmente nicht induzierter Ratten

Zum Nachweis von NBzMA-Metaboliten in Perfusaten, Resorbat und Mucosahomogenaten wurden die Proben mittels HPLC chromatographiert. Auf einer C 18-reversed phase-Säule konnte NBzMA von einer zweiten, Radioaktivität enthaltenden Fraktion getrennt werden, die im weiteren als "Metaboliten" bezeichnet werden.

a) Jejunum

Jejunumsegmente von nicht vorbehandelten Ratten wurden mit 1 μ mol/l NBzMA perfundiert. Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat dieser Perfusionsversuche wurden wie unter Methoden beschrieben auf gebildete NBzMA-Metaboliten untersucht. Bei den gewählten Chromatographiebedingungen (1 ml Probe, Probenaufgabeschleife, Elution mit einem Methanolgradienten 30 - 70 % Methanol in 5 Minuten, dann isokratisch mit 70 % Methanol in GAU-Puffer) eluierte nicht umgesetztes NBzMA bei einer Retentionszeit von 8 - 9 Minuten (bei einer Durchbruchzeit von 2 Minuten). Die Identifizierung des NBzMA-Peaks erfolgte durch Vergleich mit reinem NBzMA sowie durch Zusatz von NBzMA zu den aufgegebenen Proben. Metabolitenpeaks waren bei der Chromatographie von Perfusatproben nicht zu erkennen, ebensowenig bei der Chromatographie von Resorbatproben bei einer Nachweisgrenze von 20 - 30 pmol Metaboliten, entsprechend 2 - 3 % der in den aufgegebenen Proben enthaltenen Radioaktivität.

b) Ileum

Auch bei der Chromatographie von Proben, die aus Perfusionsversuchen mit Ileumsegmenten nicht vorbehandelter Ratten stammen, ließ sich im Perfusat und im Resorbat nur NBzMA nachweisen; hydrophile Metaboliten des NBzMA waren auch hier nicht nachweisbar.

4.1.2.2 Metabolisierung von NBzMA durch Darmsegmente ölvorbehandelter Ratten

a) Jejunum

Bei der Analyse von Proben, die aus Perfusionen ölvorbehandelter Rattendarmsegmente mit $1 \mu\text{mol/l}$ NBzMA stammten, eluierte neben nicht umgesetztem NBzMA mit einer Retentionszeit von 8 - 9 min ein weiterer radioaktiv markierter Peak mit einer Retentionszeit von 2 min. Dieser Peak mit einer Breite von etwa 90 Sekunden eluierte mit dem Durchbruchsvolumen (d.h. dem Probenlösungsmittel, welches vom Säulenmaterial nicht zurückgehalten wird); die Substanzen, die in diesem Peak enthalten sind, banden nicht an das C 18-Säulenmaterial. Durch Änderung der Laufmittel, der Elutionsgeschwindigkeit oder des Probenvolumens ließ sich die Lage dieses Peaks im Radiochromatogramm nicht beeinflussen; die Peakbreite hing ausschließlich vom Probenvolumen und der Elutionsgeschwindigkeit ab (d.h. die Breite nahm zu bei steigendem Probenvolumen und abnehmender Laufmittelgeschwindigkeit). Im weiteren Text wird der Gehalt dieses Peaks, der bei 2 - 3 min eluiert, als "Metaboliten" bezeichnet. Neben diesem einen Metabolitenpeak war in keinem Versuch ein zweiter Metabolitenpeak identifiziert worden. Das Chromatogramm einer Jejunumperfusat-Probe ist in der Abb. 2 a wiedergegeben.

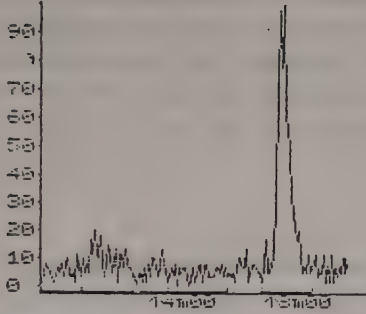
Im Perfusat einer Jejunumperfusion (von ölvorbehandelten Ratten) enthielt die Metabolitenfraktion 10,6 % der insgesamt in diesem Chromatogramm enthaltenen Radioaktivität. Die anderen 89,6 % der Radioaktivität fanden sich als nicht umgesetztes NBzMA wieder. Im Resorbat wurden 25,6 % der durchgetretenen Radioaktivität als Metaboliten wiedergefunden, während im Mucosahomogenat bereits 45 % der in der Probe enthaltenen Radioaktivität als Metaboliten eluierten. Diese drei Chromatogramme sind in der Abbildung 2 zusammengestellt; die Pfeile bezeichnen die Metabolitenfraktion (Pfeil 1) sowie das nicht umgesetzte NBzMA (Pfeil 2).

Abbildung 2

Radiochromatogramme von Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat von Jejunumperfusionen ölvorbehandelter Ratten

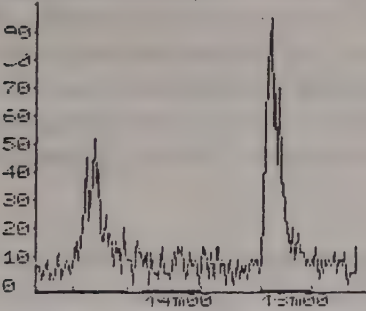
Das Perfusat (2a), Resorbat (2b) und Mucosahomogenat (2c) einer Jejunumperfusion von ölvorbehandelten Ratten wurde durch HPLC-Chromatographie auf die Bildung von NBzMA-Metaboliten analysiert. Die eingesetzte NBzMA-Konzentration betrug $1 \mu\text{mol/l}$, das Aufgabevolumen je $1000 \mu\text{l}$, die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 30 bis 70 % Methanol/GAU-Puffer in 5 Minuten, dann isokratische Elution mit 70 % Methanol/GAU-Puffer. Die gebildeten Metaboliten erschienen bei einer Retentionszeit von 2 min (Pfeil 1), während das nicht umgesetzte NBzMA bei 8 min eluierte (Pfeil 2).

100% = 17.0 cps



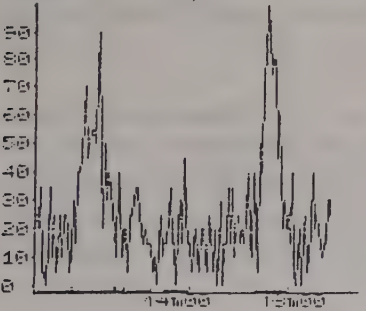
Perfusat

100% = 11.0 cps



Resorbat

100% = 5.0 cps



Mucosahomogenat

Die aus den entsprechenden Chromatogrammen ermittelten S/M-Quotienten (Radioaktivitätskonzentration im Resorbat/Radioaktivitätskonzentration im Perfusat) für die Gesamtradioaktivität, für NBzMA und die NBzMA-Metaboliten unterschieden sich erheblich voneinander. Für die Gesamtradioaktivität wurde ein S/M-Quotient von 0,8 - 0,9 gemessen, für NBzMA dagegen ein S/M-Quotient von nur 0,6 - 0,7. Dabei fällt auf, daß NBzMA während der Perfusion im Resorbat nicht angereichert wird, während die in der Metabolitenfraktion enthaltenen Umwandlungsprodukte offenbar auf der Serosaseite angereichert werden (S/M-Quotient von 2,0 - 2,8).

b) Ileum

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Analyse von Proben aus Perfusionen von Ileumsegmenten ölvorbehandelter Ratten (bei 1 μ mol/l NBzMA) erhalten. Hier fanden sich aber in allen Proben geringere Anteile der Gesamtradioaktivität als Metaboliten wieder, im Perfusat 2,7 %, im Resorbat 5,1 % und im Mucosahomogenat 18,9 %. Nur im Mucosahomogenat zeigte das Radiochromatogramm einen deutlichen Metabolitenpeak. In der Abbildung 3 sind die Radiochromatogramme von Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat einer Ileumperfusion zusammengestellt.

Aus den Radiochromatogrammen errechnete sich für die gebildeten Metaboliten ein S/M-Quotient von 1,84. Das besagt, daß auch in Ileumsegmenten die gebildeten Metaboliten während des Durchtritts durch die Darmwand auf der Serosaseite angereichert wurden.

In Jejunum- und Ileumsegmenten von ölvorbehandelten Ratten wurde während der Perfusion mit niedrigen Konzentrationen an NBzMA ein Teil der Substanzen zu hydrophilen Substanzen metabolisiert. Dabei waren Jejunumsegmente (mit 0,19 nmol/cm/h Metaboliten; vgl. Tabelle III im Anhang) wesentlich aktiver als Ileumsegmente (mit

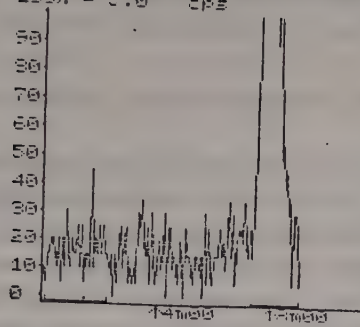


Abbildung 3

Radiochromatogramme von Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat einer Ileumperfusion ölvorbehandelter Ratten

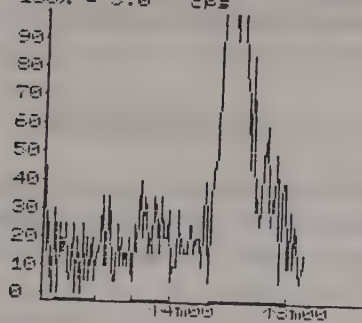
Das Perfusat (3a), Resorbat (3b) und Mucosahomogenat (3c) einer Ileumperfusion von ölvorbehandelten Ratten wurde durch HPLC-Chromatographie auf die Bildung von NBzMA-Metaboliten analysiert. Die eingesetzte NBzMA-Konzentration betrug $1 \mu\text{mol/l}$, das Aufgabevolumen jeweils $1000 \mu\text{l}$, die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 30 bis 70 % Methanol/GAU-Puffer in 5 min, dann isokratische Elution mit 70 % Methanol/GAU-Puffer. Die gebildeten Metaboliten (Pfeil 1) erschienen bei einer Retentionszeit von 2 min, während das nicht umgesetzte NBzMA (Pfeil 2) bei 8 min eluierte.

100% = 5.0 cps



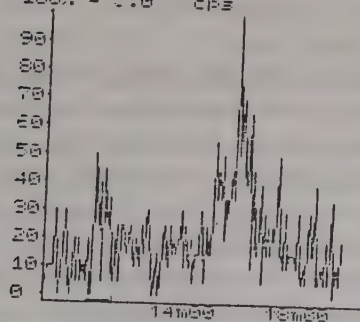
Perfusat

100% = 5.0 cps



Resorbat

100% = 5.0 cps



Mucosahomogenat

0,048 nmol/cm/h Metaboliten; Tabelle IV im Anhang). Wie die Abbildungen 2 und 3 weiterhin verdeutlichen, stieg der Metabolitenanteil der in den Proben enthaltenen Gesamtradioaktivität in der Reihenfolge Mucosahomogenat > Resorbat > Perfusat in beiden geprüften Dünndarmabschnitten an.

4.2 Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen

Durch Verabreichung von Induktionsmitteln läßt sich der Gehalt an Cytochrom P 450 in mehreren Organen verändern, d.h. daß sich mit geeigneten Induktoren einzelne Stoffwechselwege fördern oder hemmen lassen (Remmer, 1977). Für NBzMA sollte untersucht werden, ob durch Induktion der Stoffwechsel von NBzMA beeinflusst werden kann. Dazu erhielten die Ratten vor der Versuchsdurchführung Phenobarbital (PB) bzw. 3-Methylcholanthren (3-MC), zwei Modellsubstanzen für die Enzyminduktion in der Leber.

4.2.1. Induktion mit 3-Methylcholanthren

Durch 3-MC-Vorbehandlung lassen sich die als Cytochrom P 448 zusammengefaßten Enzyme induzieren. Als Kontrolle erhielt eine weitere Gruppe Ratten nur das Lösungsmittel verabreicht (entspricht den ölvorbehandelten Ratten).

a) Jejunum

Gegenüber den ölvorbehandelten Tieren war die Bildung von Metaboliten bei der 3-MC-induzierten Gruppe ($1 \mu\text{mol/l}$ NBzMA) deutlich reduziert. Während im Jejunumperfusat der ölvorbehandelten Tiere etwa 10 % der Radioaktivität als Metaboliten wiedergefunden wurden, sank dieser Anteil nach 3-MC-Induktion auf 1,1 %. Im Resorbat sank der Metabolitenanteil von 25 % bei den ölvorbehandelten Tieren auf 14 % nach 3-MC-Induktion, und im Mucosahomogenat von 46 % auf 16 %. Die nach der Induktion mit 3-MC erhaltenen Werte sind den nach Ölvorbehandlung bzw. bei nicht induzierten Rattendarmsegmenten erhaltenen Meßergebnissen in der Tabelle 3 gegenübergestellt.

Berechnet man die Gesamtmenge der während der Perfusion gebildeten Metaboliten, so wurden von den Jejunumsegmenten 3-MC-induzierter Ratten 0,035 nmol Metaboliten pro Stunde Perfusion und pro cm Darmlänge gebildet gegenüber 0,42 nmol/cm/h Metaboliten, die durch Jejunumsegmente ölvorbehandelter Ratten gebildet wurden.

Der durch Jejunumsegmente von 3-MC-induzierten Ratten erhaltene Metabolismus war wesentlich geringer als der Metabolismus, der bei Jejunumsegmente ölvorbehandelter Ratten gemessen wurde; die Metabolitenmengen entsprachen in etwa den bei nicht vorbehandelten Ratten gefundenen Metabolitenmengen. Die Gabe von 3-MC an Ratten führte zu keiner Steigerung des NBzMA-Stoffwechsels; der bei der Gabe von Öl allein beobachtete Induktionseffekt wurde sogar noch aufgehoben.

b) Ileum

Die Analyse der nach Ileumperfusionen 3-MC-induzierter Ratten erhaltenen Ergebnisse waren den bei Jejunumperfusionen gemessenen Werten qualitativ gleich. Auch im Ileum wurden nur sehr geringe Metabolitenmengen gemessen, die mengenmäßig den durch nicht induzierte Ratten gebildeten Metabolitenmengen entsprachen. Die pro cm Darm und pro Stunde gebildete Metabolitenmenge war mit 0,011 nmol/cm/h ebenfalls nicht signifikant größer als die bei nicht induzierten Ratten gemessene Menge von 0,006 nmol/cm/h Metaboliten. Die nach Induktion mit 3-MC, nach Ölvorbehandlung bzw. bei nicht induzierten Jejunum- und Ileumperfusionen erhaltenen Werte sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Sowohl im Jejunum als auch im Ileum wurde der nach Gabe von Öl (Lösungsmittel für Phenobarbital und 3-Methylcholanthren) beobachtete Anstieg des NBzMA-Stoffwechsels also durch Gabe von 3-MC wieder rückgängig gemacht. Der Metabolitenanteil sank nach 3-MC-

Tabelle 3

Einfluß von Induktionsmitteln auf den NBzMA-Metabolismus

Die Ratten wurden an 3 (bei 3-MC-Induktion) bzw. 4 (bei PB-Induktion) vorhergehenden Tagen mit dem Induktionsmittel vorbehandelt; Kontrolltiere erhielten nur Öl. Nach Perfusion der Jejunum- und Ileumsegmente mit 1 μ mol/l NBzMA wurde der Anteil der NBzMA-Metaboliten im Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat durch HPLC-Chromatographie bestimmt und in Prozent der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität angegeben. Aus der Gesamtmenge der in allen Fraktionen gefundenen Metabolitenmenge wurde die Metabolisierungsgeschwindigkeit errechnet und in nmol NBzMA-Metaboliten pro cm Darmlänge und pro Stunde Perfusionsdauer angegeben. Zusätzlich werden die nach Zusatz von 1 mmol/l SK&F 525 A zum Perfusionsmedium erhaltenen Metabolitenmengen angegeben. Für diese Versuche wurden Darmsegmente von PB-induzierten Ratten verwendet.

Perfusat	Resorbat	Mucosahomogenat	Metaboliten
			nmol/cm/h

Jejunum

keine Vorbehandlung	2,7 %	4,3 %	nicht bestimmt	0,05
Ölkontrolle	10,6 %	25,6 %	46 %	0,19
Methylcholanthren	1,1 %	14 %	16,2 %	0,035
Phenobarbital	16,0 %	44,4 %	44,2 %	0,415
1 mmol/l SK&F 525 A	2,7 %	9,1 %	nicht bestimmt	0,065

Ileum

keine Vorbehandlung	< 1 %	< 1 %	nicht bestimmt	0,006
Ölkontrolle	2,7 %	5,1 %	18,9 %	0,048
Methylcholanthren	< 1 %	1,4 %	15,1 %	0,011
Phenobarbital	2,9 %	8,8 %	22,6 %	0,055
1 mmol/l SK&F 525 A	1,9 %	3,1 %	nicht bestimmt	0,0375

Induktion in allen Fraktionen wieder auf die Werte ab, die für nicht vorbehandelte Ratten gemessen worden sind. Dies macht eine Beteiligung der durch 3-MC induzierbaren Isoenzyme des Rattendarms am NBzMA-Stoffwechsel unwahrscheinlich.

4.2.2 Induktion mit Phenobarbital

Analog zur Vorbehandlung von Ratten mit 3-MC wurden Ratten mit Phenobarbital (80 mg/kg Körpergewicht, intragastral, in Öl gelöst) vorbehandelt. Diese Vorbehandlung führte zur Induktion der als Phenobarbital-induzierbaren Cytochrom P 450 Gruppe bezeichneten Enzyme.

a) Jejunum

Bei der Perfusion eines Jejunumsegmentes von PB-induzierten Ratten mit 1 μ mol/l NBzMA fanden sich im Perfusat 16 % der Radioaktivität in der Metabolitenfraktion wieder, gegenüber 10,6 % bei ölvorbehandelten Tieren. Im Resorbat waren 44,4 % der Radioaktivität als Metaboliten nachweisbar (gegenüber 25,6 %), im Mucosahomogenat ebenfalls 44,2 % (bei ölvorbehandelten Jejunumsegmenten 46 %).

Die HPLC-Chromatogramme von Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat eines PB-induzierten Jejuns sind in Abb. 4 a - c wiedergegeben. Zum Vergleich hierzu zeigt Abb. 2 a - c die entsprechenden Radiochromatogramme von ölvorbehandelten Rattenjejunumsegmenten.

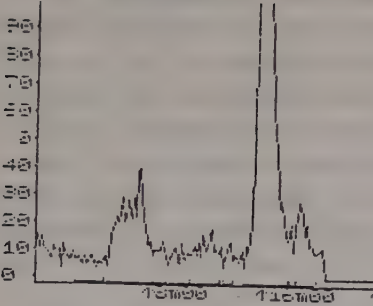
Insgesamt wurden von Jejunumsegmenten PB-induzierter Ratten 0,415 nmol/cm/h Metaboliten gebildet, d.h. es resultierte eine fast zehnfache Steigerung gegenüber nicht vorbehandelten Tieren (0,05 nmol/cm/h) und noch zweifach gegenüber den mit Öl vorbehandelten Tieren (0,19 nmol/cm/h; vgl. Tabelle 3).

Abbildung 4

Radiochromatogramme von Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat von Jejunumsegmenten PB-induzierter Ratten

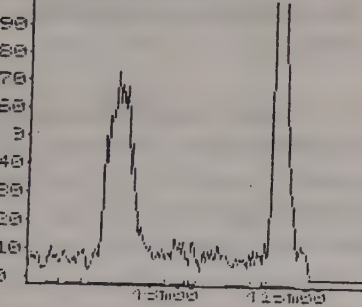
Perfusat (4a), Resorbat (4b) und Mucosahomogenat (4c) eines Jejunumsegments von Phenobarbital-induzierten Ratten wurden durch HPLC-Chromatographie auf die Bildung von NBzMA-Metaboliten analysiert. Die eingesetzte NBzMA-Konzentration betrug $1 \mu\text{mol/l}$, das Aufgabevolumen je $1000 \mu\text{l}$, die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 30 bis 70 % Methanol/GAU-Puffer in 5 Minuten, dann isokratische Elution mit 70 % Methanol/GAU-Puffer. Beim Perfusat und Resorbat wurde mit einer Elutionsgeschwindigkeit von $0,4 \text{ ml/min}$, beim Mucosahomogenat mit 1 ml/min analysiert. Die gebildeten Metaboliten (Pfeil 1) erschienen bei einer Retentionszeit von 2 min, während das nicht umgesetzte NBzMA (Pfeil 2) bei 8 min eluierte.

100% = 20.0 CPM



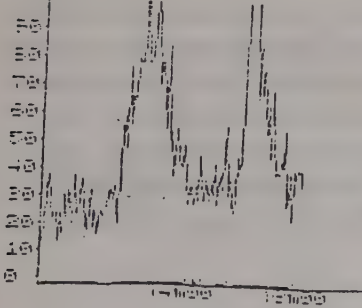
Perfusat

100% = 20.0 CPM



Resorbat

100% = 20.0 CPM



Mucosahomogenat

b) Ileum

In Ileumsegmenten war eine Induktion des NBzMA-Metabolismus durch Phenobarbital gegenüber den ölvorbehandelten Tieren nicht nachweisbar. Gegenüber nicht vorbehandelten Tieren ergab sich aber eine deutliche Steigerung des Stoffwechsels. Während bei nicht vorbehandelten Ratten weder im Perfusat noch im Resorbat von Ileumperfusionen Metaboliten nachweisbar waren, wurden im Perfusat nach PB-Induktion 2,9 % und bei Ölkontrollen 2,7 % als Metaboliten identifiziert. Im Resorbat fanden sich nach PB-Induktion 8,8 % (bei Ölkontrollen 5,1 %) und in Mucosahomogenaten 22,6 % gegenüber 18,9 % in Ölkontrollen. Insgesamt wurden durch Ileumsegmente von PB-induzierten Ratten 0,055 nmol/cm/Stunde Metaboliten gebildet, gegenüber 0,006 nmol/cm/Stunde durch Ileumsegmente nicht vorbehandelter Ratten und 0,048 nmol/cm/Stunde durch Ileumsegmente ölvorbehandelter Ratten. Auch hier war also eine etwa zehnfache Stimulierung durch die PB-Induktion gegenüber nicht vorbehandelten Ratten zu beobachten; eine Steigerung gegenüber der Ölkontrollen war dagegen für das Ileum nicht zu erkennen.

In den Abbildungen 4 und 5 sind die für Jejunum- und Ileumsegmente PB-induzierter Ratten erhaltenen Chromatogramme (Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat) zusammengefasst. Deutlich ist zu erkennen, daß der relative Anteil der Metabolitenfraktion, wie schon bei den Ölkontrollen zu beobachten war, sowohl bei Jejunum- als auch bei Ileumperfusionen in der Reihenfolge Perfusat < Resorbat < Mucosahomogenat zunahm.

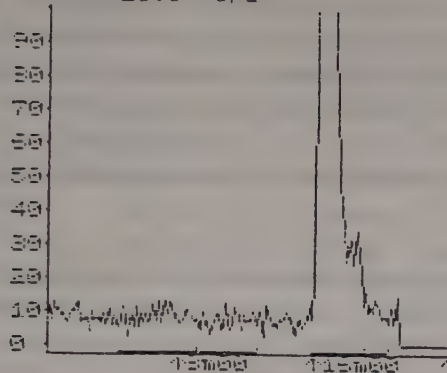
Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe zeigten, daß sich durch Vorbehandlung von Ratten mit Phenobarbital der NBzMA-Stoffwechsel stark stimulieren ließ. Dabei wurde der Metabolismus in Jejunum und Ileum gleichermaßen gegenüber nicht induzierten Ratten um das Zehnfache gesteigert. Diese Stimulation ging aber nur bei Jejunumsegmenten über die bereits mit dem Lösungsmittel erreichte Stimulation hinaus; in Ileumsegmenten ließ sich durch PB-Induk-

Abbildung 5

Radiochromatogramme von Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat von Ileumperfusionen PB-induzierter Ratten

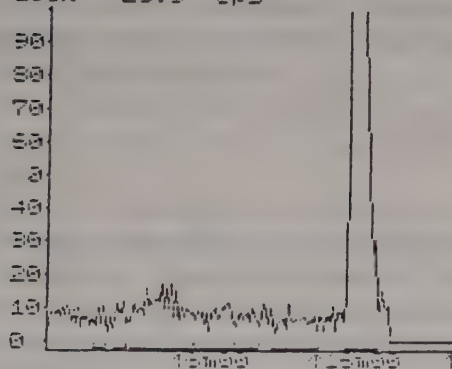
Perfusat (5a), Resorbat (5b) und Mucosahomogenat (5c) eines Ileumsegmentes von Phenobarbital-induzierten Ratten wurde durch HPLC-Chromatographie auf die Bildung von NBzMA-Metaboliten analysiert. Die eingesetzte NBzMA-Konzentration betrug $1 \mu\text{mol/l}$, das Aufgabevolumen je $1000 \mu\text{l}$, die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 30 bis 70 % Methanol/GAU-Puffer in 5 min, dann isokratische Elution mit 70 % Methanol/GAU-Puffer. Beim Perfusat und Resorbat wurde mit $0,4 \text{ ml/min}$, beim Mucosahomogenat mit 1 ml/min analysiert. Die gebildeten Metaboliten erschienen bei einer Retentionszeit von 2 min (Pfeil 1), während das nicht umgesetzte NBzMA bei 8 min (Pfeil 2) eluierte.

100% = 20.0 cps



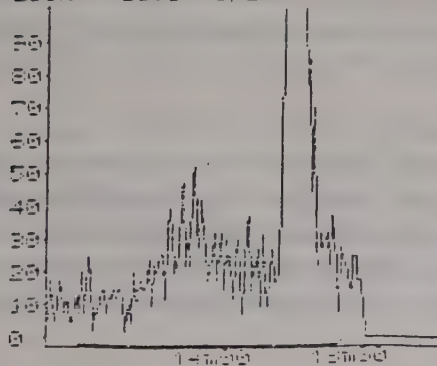
Perfusat

100% = 20.0 cps



Resorbat

100% = 10.0 cps



Mucosahomogenat

tion gegenüber den mit Öl-Vorbehandlung gemessenen Werten keine weitere Stimulation des NBzMA-Stoffwechsels nachweisen. Des weiteren ist den Abbildungen 4 und 5 sowie der Tabelle 3 zu entnehmen, daß auch nach PB-Induktion durch Jejunumsegmente wesentlich mehr Metaboliten gebildet wurden als durch Ileumsegmente.

4.2.3 Hemmung des NBzMA-Stoffwechsels durch Cytochrom P 450 Inhibitoren

Da der NBzMA-Stoffwechsel durch Phenobarbital induzierbar ist, liegt die Annahme von Cytochrom P 450-vermittelten Reaktionen für die Metabolisierung von NBzMA nahe. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Jejunum- und Ileumsegmente von PB-induzierten Ratten mit $1 \mu\text{mol/l}$ SK&F 525 A perfundiert. Zusätzlich wurde dem Perfusionsmedium 1 mM SK&F 525 A zugesetzt, eine Substanz, die bekanntermaßen Cytochrom P 450-vermittelte Reaktionen hemmt (Netter, 1982).

a) Jejunum

Nach SK&F 525 A-Zusatz fanden sich im Perfusat $2,7 \%$ der Radioaktivität, gegenüber 16% ohne Zusatz des Hemmstoffes (d.h. nach PB-Induktion allein), als Metaboliten wieder. Im Resorbat sank der Metabolitenanteil von $44,4 \%$ ohne Hemmstoff auf $9,1 \%$ ab. Dies entsprach einer Hemmung des Stoffwechsels um etwa 80% . Insgesamt wurden $0,065 \text{ nmol/cm/Stunde}$ Metaboliten gebildet, d.h. 15% der von PB-induzierten Jejunumsegmenten gebildeten Menge. Die nach Zusatz von SK&F 525 A zum Perfusionsmedium (bei der Perfusion eines PB-induzierten Jejunumsegmentes) sind in der Tabelle 3 den ohne Zusatz des Hemmstoffes erhaltenen Werten gegenübergestellt.

Diese nach Zusatz des Cytochrom-P-450-Inhibitors erhaltenen Werte waren vergleichbar den nach 3-MC-Induktion erhaltenen Ergebnissen (Perfusat $1,1 \%$ Metaboliten, Resorbat 14% Metaboliten) sowie den Werten, die bei der Perfusion von nicht vorbehandelten Jejunumsegmenten erhalten wurden. Sie waren jedoch wesentlich geringer als die bei Öl-Vorbehandlung gemessenen Metabolitenmengen.

b) Ileum

Die Hemmung des NBzMA-Stoffwechsels durch Zusatz von SK&F 525 A zum Perfusionsmedium ließ sich auch bei der Perfusion von PB-induzierten Ileumsegmenten nachweisen. Hier war im Perfusat der Anteil der Metaboliten von 2,9 % nach PB-Induktion auf 1,9 % gesenkt, im Resorbat von 8,8 % (bei PB-Induktion) auf noch 3,1 % Metaboliten nach SK&F 525 A-Zusatz. Diese Werte waren aber immer noch größer als die bei nicht vorbehandelten Tieren gemessene Metabolitenmenge, bei denen weniger als 1 % Metaboliten im Perfusat und Resorbat gefunden wurden.

Durch Zusatz des Cytochrom P 450-Hemmstoffes SK&F 525 A ließ sich der Effekt der Ölvorbehandlung und der PB-Induktion in Jejunum und Ileum wieder rückgängig machen. Der gemessene Metabolismus entsprach dem Metabolismus nicht vorbehandelter Tiere. Im Ileum war der Hemmeffekt von SK&F 525 A nicht so ausgeprägt, gegenüber der PB-Induktion wurde hier nur eine Hemmung von etwa 35 % beobachtet.

4.3. Konzentrationsabhängigkeit des NBzMA-Metabolismus

Durch Variation der eingesetzten NBzMA-Konzentration sollte geklärt werden, ob der Metabolismus von NBzMA sich konzentrationsabhängig ändert, und ob bei höheren Substratkonzentrationen weitere Metaboliten erscheinen. Wegen der geringen Aktivität der Darmsegmente nicht vorbehandelter Tiere wurden diese Versuche ausschließlich mit PB-induzierten Ratten durchgeführt.

a) Jejunum

Bei der Perfusion von Jejunumsegmenten PB-induzierter Ratten mit steigenden NBzMA-Konzentrationen (0,3 - 500 $\mu\text{mol/l}$) zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der insgesamt gebildeten Metabolitenmenge von 0,12 nmol/cm/h (bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA im Perfusat) auf 44,8 nmol/cm/h (bei 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA). Der Anstieg

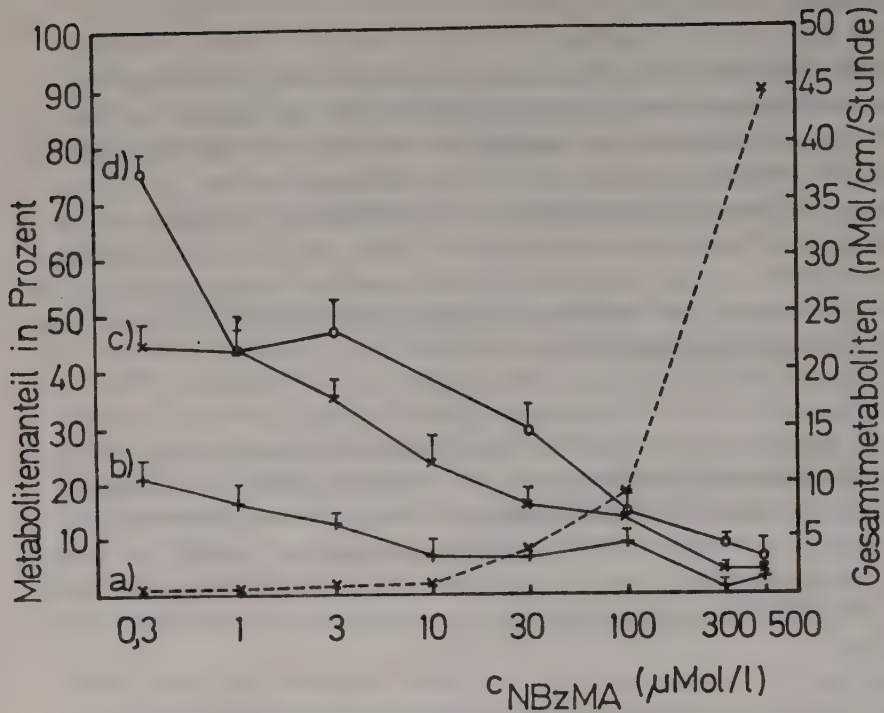


Abbildung 6

Konzentrationsabhängigkeit des NBzMA-Metabolismus bei Jejunumsegmenten PB-vorbehandelter Ratten.

Jejunumsegmente von Phenobarbital-induzierten Ratten wurden mit 0,3 - 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA perfundiert. In Perfusaten, Resorbat und Mucosahomogenaten dieser Perfusionen wurde durch HPLC-Chromatographie die gebildete Metabolitenmenge bestimmt. Aus der insgesamt gebildeten Metabolitenmenge wurde die Geschwindigkeit der Metabolitenbildung in nmol Metaboliten pro cm Darmlänge und pro Stunde Perfusionsdauer errechnet.

Eingezeichnet ist die Metabolisierungsgeschwindigkeit (-----) (nmol/cm Darmlänge/Stunde) (Kurve a) sowie der prozentuale Anteil der Metaboliten an der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität im Perfusat (+---+---+) (Kurve b), im Resorbat (x-x-x-x-x) (Kurve c) sowie im Mucosahomogenat (o-o-o-o-o) (Kurve d). Die Länge der Balken nach oben gibt die Standardabweichung ($\bar{x} \pm \text{S.E.}$) der in mehreren Parallelversuchen erhaltenen Meßwerte (3 - 5 Einzelmessungen, vgl. Tabelle III im Anhang) an.

erfolgte über den gesamten Konzentrationsbereich; während die NBzMA-Konzentration um das 100-fache gesteigert wurde, stieg die Metabolitenmenge dabei auf das 33-fache. Die gebildeten Metabolitenmengen (in μmol Metaboliten pro cm Darmlänge und pro Stunde Perfusionsdauer) sind in der Abbildung 6 gegen die eingesetzte NBzMA-Konzentration aufgetragen (Kurve a, vergleiche auch Tabellen I und III im Anhang).

Man erkennt aus der Abbildung 6, daß der prozentuale Anteil der Metaboliten an der eingesetzten Substratmenge im Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat mit steigender NBzMA-Konzentration abnahm. Während bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA im Perfusat 20 % der Radioaktivität als Metaboliten erschienen, waren bei 10 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA noch 6 %, bei 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA nur noch 1,4 % des NBzMA während der Perfusionsdauer metabolisiert worden. Im Resorbat wurden bei niedrigen Konzentrationen (0,3 bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA) etwa 45 % der Radioaktivität als Metaboliten wiedergefunden. Dieser Anteil fiel bei steigender NBzMA-Konzentration über 24 % (bei 10 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA) auf 4 % Metaboliten bei 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA; bei 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA waren noch 2,2 % Metaboliten nachweisbar. In Mucosahomogenaten zeigte sich eine analoge Abnahme des Metabolitenanteils, der von 40 - 60 % bei niedrigen Konzentrationen auf noch 10 % bei hohen Substratkonzentrationen fiel. Die einzelnen Meßwerte sind in der Tabelle III im Anhang zusammengefaßt.

Die aus den HPLC-Chromatogrammen von Perfusat- und Resorbatproben berechneten S/M-Quotienten für Metaboliten und NBzMA sind in der Abb. 7 in Abhängigkeit von der eingesetzten NBzMA-Konzentration aufgetragen. Sowohl für die Gesamtradioaktivität als auch für nicht umgesetztes NBzMA (nicht eingezeichnet) war bei Jejunumsegmenten bei keiner Konzentration ein S/M-Quotient über 1 gemessen worden (vgl. auch Tabelle III im Anhang).

Für die Metaboliten wurde dagegen ein S/M-Quotient größer als 1 bestimmt. Er betrug 1,85 bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA und stieg auf einen Maximalwert von 3 (bei 1 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA) an. Dieser Anstieg war darauf zurückzuführen, daß der Metabolitenanteil im Perfusat

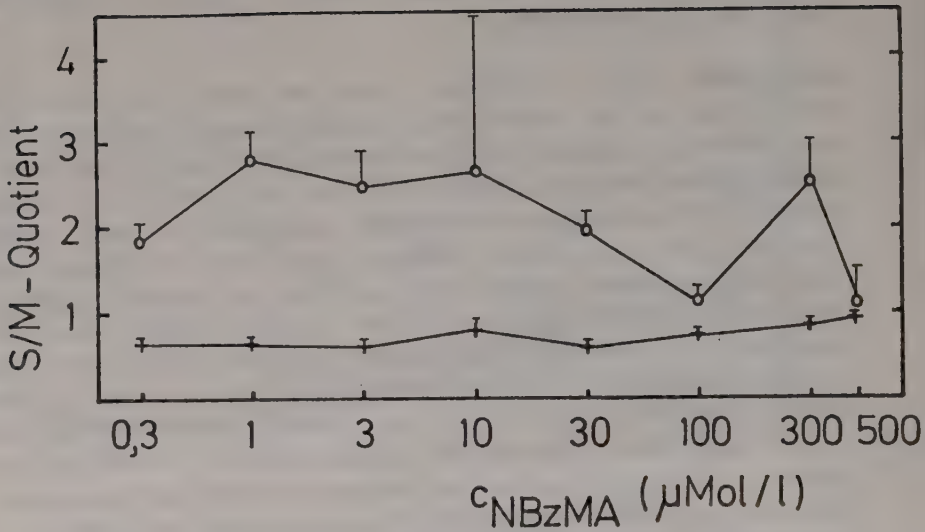


Abbildung 7

Konzentrationsabhängigkeit der S/M-Quotienten für NBzMA und NBzMA-Metaboliten in Jejunumsegmenten von PB-induzierten Ratten.

Rattenjejunumsegmente wurden mit 0,3 - 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA perfundiert. Durch HPLC-Chromatographie wurde die im Perfusat und im Resorbat befindliche Metabolitenkonzentration bestimmt. Hieraus wurde der S/M-Quotient (Resorbat/Perfusat) berechnet. Aus den Ergebnissen von 3 - 5 Parallelversuchen wurde der Mittelwert errechnet. Eingezeichnet sind die S/M-Quotienten für die gebildeten NBzMA-Metaboliten (0-0-0-0) sowie das nicht umgesetzte NBzMA (+----+). Die Höhe der Balken gibt die Standardabweichung (S.E.) dieser Parallelversuche an.

abnahm, während er im Resorbat gleichblieb. Bei einer weiteren Erhöhung der NBzMA-Konzentration sank der Metabolitengehalt im Resorbat ab, parallel hierzu fiel der S/M-Quotient für die Metaboliten auf 1,1 ab (bei 100 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA).

Der S/M-Quotient für die Gesamtradioaktivität änderte sich mit der Konzentration nicht, während der S/M-Quotient für nicht metabolisiertes NBzMA bei niedrigen NBzMA-Konzentrationen 0,6 betrug. Bei höheren Substratkonzentrationen, d.h. über 30 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA, stieg der S/M-Quotient an und erreichte 0,85 bei 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA. Wegen des geringen Metabolitenanteils bei hohen NBzMA-Konzentrationen war hier der S/M-Quotient für NBzMA gleich dem für die Gesamtradioaktivität ermittelten Wert. Die einzelnen S/M-Quotienten sind der Tabelle III im Anhang zu entnehmen.

Wie die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, stieg der Gesamtmetabolismus von NBzMA nach der Induktion von Ratten mit PB mit steigender Substratkonzentration an. Der prozentuale Metabolitenanteil am NBzMA fiel jedoch mit steigender Konzentration ab. Eine maximale Metabolisierungsgeschwindigkeit ist im untersuchten Konzentrationsbereich bis 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA nicht zu erkennen, auch bei hohen NBzMA-Konzentrationen nahm bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration die Metabolisierungsgeschwindigkeit weiter zu.

b) Ileum

Qualitativ gleiche Ergebnisse wie sie für Jejunumsegmente erhalten wurden, wurden auch bei der Perfusion von Ileumsegmenten mit steigenden NBzMA-Konzentrationen beobachtet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der Abbildung 8 sowie den Tabellen II und IV im Anhang zusammengefaßt. Der Anteil der Metaboliten an der Gesamtradioaktivität nahm im Perfusat von 3,7 % (bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA) ab auf 1 % bei 30 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA. Im Resorbat fiel der Metabolitenanteil von 9 % (bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA) auf 2,3 % (bei 30 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA); bei 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA wurden im Resorbat noch 1,3 % der Radioaktivität als Metaboliten gefunden. Im

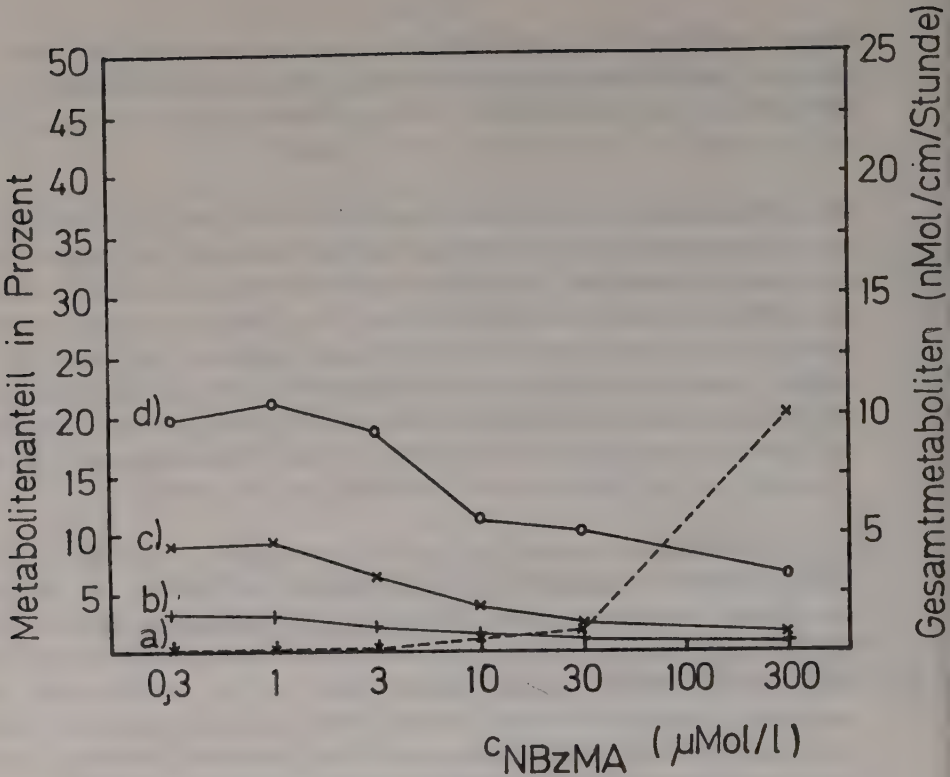


Abbildung 8

Konzentrationsabhängigkeit des NBzMA-Metabolismus bei Ileumsegmenten PB-vorbehandelter Ratten.

Ileumsegmente von Phenobarbital-induzierten Ratten wurden mit 0,3 - 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA perfundiert. In Perfusaten, Resorbat und Mucosahomogenaten dieser Perfusionen wurde durch HPLC-Chromatographie die gebildete Metabolitenmenge bestimmt. Aus der insgesamt gebildeten Metabolitenmenge wurde die Geschwindigkeit der Metabolitenbildung in nmol Metaboliten pro cm Darmlänge und pro Stunde Perfusionsdauer errechnet.

Eingezeichnet ist die Metabolisierungsgeschwindigkeit (-----) (nmol/cm Darmlänge/Stunde) (Kurve a) sowie der prozentuale Anteil der Metaboliten an der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität im Perfusat (+--+--+--) (Kurve b), im Resorbat (x-x-x-x-x) (Kurve c) sowie im Mucosahomogenat (o-o-o-o-o) (Kurve d). Auf die Angabe von Standardabweichungen wird wegen der geringen Fallzahl verzichtet.

Mucosahomogenat wurden bei 3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA etwa 20 % der Radioaktivität verstoffwechselt. Dieser Anteil fiel auf 10 % bei 30 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA und 8 % bei 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA.

Wie bereits bei Jejunumsegmenten beobachtet, stieg auch in Ileumsegmenten die Gesamtmenge gebildeter Metaboliten mit steigender NBzMA-Konzentration an. Während bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA 0,055 nmol/cm/h Metaboliten gebildet wurden, wurden bei 10 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA 0,36 nmol/cm/h, bei 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA bereits 5.45 nmol/cm/h Metaboliten gebildet (siehe Abbildung 8, Kurve a, und Tabelle IV im Anhang).

Die S/M-Quotienten für die Gesamtradioaktivität, für NBzMA sowie die NBzMA-Metaboliten änderten sich bei Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der eingesetzten NBzMA-Konzentration in analoger Weise wie für Jejunumsegmente beschrieben (siehe auch Abbildung 9). Während der S/M-Quotient für die Gesamtradioaktivität weitgehend unabhängig von der Konzentration des NBzMA zwischen 0,9 und 1,0 schwankte, wurde für nicht umgesetztes NBzMA jeweils ein etwas kleinerer S/M-Quotient zwischen 0,90 und 0,98 gemessen. Für die gebildeten Metaboliten errechnete sich ein S/M-Quotient von 2 - 3 (im niedrigen Konzentrationsbereich); bei höheren Konzentrationen näherte er sich 1 an. Dieser Anreicherung entspricht auch der geringe Unterschied zwischen den S/M-Quotienten für die Gesamtradioaktivität und dem nicht umgesetzten NBzMA.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß auch bei Ileumsegmenten mit steigender NBzMA-Konzentration eine Zunahme des Metabolismus stattfand. Der Metabolismus entsprach aber nur 1/4 bis 1/5 der im Jejunum gemessenen Metabolisierungsgeschwindigkeit. Dementsprechend war auch der prozentuale Anteil der Metaboliten im Perfusat, Resorbat und Mucosahomogenat nach Ileumperfusionen geringer als in den entsprechenden Proben von Jejunumperfusionen. Während der Perfusion wurden im niedrigen Konzentrationsbereich die gebildeten Metaboliten auf der serosalen Seite gegenüber der mucosalen Seite angereichert. Nicht umgesetztes NBzMA fand sich dagegen auf der mucosalen Seite in etwas geringerer Konzentration als auf der serosalen Seite.

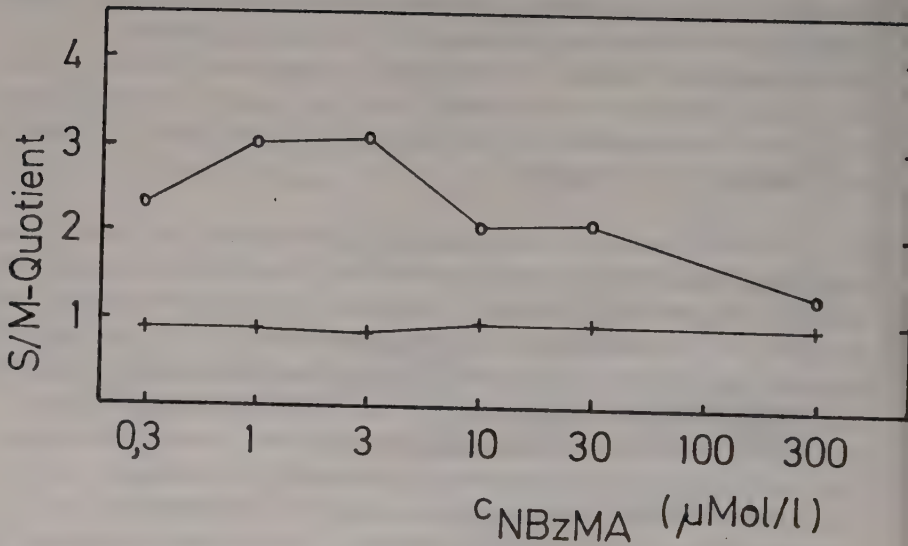


Abbildung 9

Konzentrationsabhängigkeit der S/M-Quotienten für NBzMA und NBzMA-Metaboliten in Ileumsegmenten von PB-induzierten Ratten.

Rattenileumsegmente wurden mit 0,3 - 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA perfundiert. Durch HPLC-Chromatographie wurde die im Perfusat und im Resorbat befindliche Metabolitenkonzentration bestimmt. Hieraus wurde der S/M-Quotient (Resorbat/Perfusat) errechnet. Eingezeichnet sind die S/M-Quotienten für die gebildeten NBzMA-Metaboliten (0-0-0-0) sowie das nicht umgesetzte NBzMA (+--+--+). Wegen der geringen Anzahl von Parallelexperimenten wird auf die Angabe der Standardabweichungen verzichtet.

4.4. Versuche zur Charakterisierung der Metabolitenfraktion

Wie aus den Radiochromatogrammen der Abbildungen 2 bis 5 zu ersehen ist, wurde bei der Perfusion von NBzMA durch Rattendarmsegmente (Jejunum und Ileum) vor allem nach Vorbehandlung der Tiere mit dem Induktionsmittel Phenobarbital ein Teil des NBzMA metabolisiert. Diese Metaboliten erschienen im Radiochromatogramm immer im Durchbruchsvolumen der HPLC-Säule, d.h. sie waren wesentlich hydrophiler als die Ausgangssubstanz.

Prinzipiell kann NBzMA durch Hydroxylierungsreaktionen am aromatischen Ringsystem oder an der alpha-Methylgruppe metabolisiert werden. Die zweite Reaktionsmöglichkeit führt zur Bildung von Methanol, Formaldehyd, Ameisensäure und CO_2 als mögliche, radioaktiv markierte Metaboliten sowie Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoessäure als nicht radioaktiv markierte Metaboliten, während die erste Reaktionsmöglichkeit ringhydroxylierte Metaboliten des NBzMA erzeugt. Daneben besteht die Möglichkeit zur Abspaltung der Nitrosogruppe, die zum denitrosierten sekundären Amin führt. Weitere Möglichkeiten zur Bildung von NBzMA-Metaboliten bestehen nicht. In weitergehenden Versuchen sollte daher geklärt werden, welche Substanzen als Stoffwechselprodukte des NBzMA gebildet werden.

4.4.1 Bildung von CO_2

Durch alpha-Oxidation des NBzMA kann Methanol bzw. Formaldehyd gebildet werden, welches durch Weiteroxidation in CO_2 umgewandelt werden kann. Während der Versuchsdurchführung gebildetes ^{14}C - CO_2 wurde durch die fortlaufende Belüftung mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) in die Carbogen-Waschflasche (III) transportiert und konnte dort quantitativ bestimmt werden. Wie bereits im Kapitel 4.1.2 erläutert wurde, erfolgte keine Verschleppung von Butanol in die Waschflaschen III und IV, so daß die gesamte dort gemessene Radioaktivität als CO_2 angesehen wurde.

a) Jejunum

Bei der Perfusion von Jejunumsegmenten PB-induzierter Ratten wurden bei niedrigen NBzMA-Konzentrationen (0,3 - 10 $\mu\text{mol/l}$) im Perfusionsmedium zwischen 0,1 - 0,8 % der Gesamtradioaktivität als CO_2 wiedergefunden. Demgegenüber wurden bei der HPLC-Chromatographie zwischen 12 und 25 % der Gesamtradioaktivität als Metaboliten im Perfusat und Resorbat wiedergefunden. Bei höheren NBzMA-Konzentrationen (über 10 $\mu\text{mol/l}$) sank dann der Anteil des gebildeten CO_2 rasch ab und erreichte bei 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA im Perfusionsmedium 0,01 % der eingesetzten Gesamtradioaktivität. In gleicher Weise sank auch im Perfusat und Resorbat der durch HPLC gemessene Metabolitenanteil ab (vgl. Abb. 6 und Tabelle III im Anhang); bei 300 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA wurden noch 4 % der Gesamtradioaktivität als Metaboliten identifiziert (durch HPLC-Chromatographie).

Neben diesem in den Waschflaschen III und IV gefundenen CO_2 konnte weiteres $^{14}\text{C-CO}_2$ im Perfusat und Resorbat gelöst sein. Diese Möglichkeit wurde durch Destillation von Perfusaten und durch Waschen des Gasstromes mit gesättigter Ba(OH)_2 -Lösung überprüft. Physikalisch gelöstes CO_2 wurde hierbei als Bariumcarbonat ausgefällt und konnte durch anschließende Radioaktivitätsmessung des wiederaufgelösten Feststoffes nachgewiesen werden. Weder bei der Destillation von Perfusaten noch von Resorbaten konnte jedoch auf diesem Wege eine signifikante Menge $^{14}\text{C-CO}_2$ im Perfusat oder Resorbat nachgewiesen werden.

Nach Induktion von Ratten mit 3-MC oder bei Zusatz des Hemmstoffes SK&F 525 A wurden bei allen Jejunumperfusionen weniger als 0,05 % der eingesetzten Gesamtradioaktivität als CO_2 wiedergefunden.

b) Ileum

Bei der Perfusion von Ileumsegmenten wurde bei unbehandelten Ratten, nach Induktion mit 3-MC und nach Zusatz von SK&F 525 A

nur sehr geringe Mengen CO_2 gefunden (weniger als 0,001 % der Gesamtradioaktivität). Die Menge des gebildeten CO_2 konnte auch durch Induktion der Ratten mit PB nicht gesteigert werden.

In Darmsegmenten nicht induzierter Ratten bzw. nach der Induktion von Ratten mit 3-MC wurden nur sehr geringe Mengen CO_2 gebildet. Dagegen wurde die CO_2 -Produktion durch PB-Induktion in Jejunumsegmenten stark stimuliert. ^{14}C - CO_2 erschien jedoch nicht als Hauptmetabolit des NBzMA-Stoffwechsels, sondern machte in allen Fällen maximal 5 % der insgesamt gebildeten Metaboliten aus. In Ileumsegmenten war keine signifikante CO_2 -Produktion nachweisbar.

4.4.2. Nachweis nicht konjugierter Metaboliten

Da bei der Perfusion von Darmsegmenten nicht induzierter Ratten zu geringe Metabolitenmengen für die Charakterisierungsmethoden gebildet wurden, wurden die nachstehend beschriebenen Versuche zur Charakterisierung der in den Radiochromatogrammen wiedergefundenen Metaboliten nur mit Perfusaten und Resorbaten von PB-induzierten Darmsegmenten durchgeführt, in denen die größte Metabolitenkonzentration gefunden worden waren. Auf die Untersuchung von Proben aus Perfusionen von anders vorbehandelten Ratten wurde verzichtet.

Zur Messung flüchtiger Metaboliten (Methanol und Formaldehyd) im Perfusat und Resorbat wurde die Gesamtmabolitenfraktion durch Chromatographie an C 18-Bond Elut-Kartuschen vom NBzMA abgetrennt. Diese Metabolitenfraktion wurde entweder direkt für weitere Untersuchungen eingesetzt, oder die Metaboliten wurden durch Gefriertrocknen und Wiederaufnahmen in wenig Wasser konzentriert.

Nach dem Gefriertrocknen von Perfusaten PB-induzierter Jejunumsegmente wurden 30 - 50 % der eingesetzten Radioaktivität im festen, weißen Rückstand gemessen; der Rest der Radioaktivität (50 - 70 %) war in die Gasphase übergegangen und wurde als flüchtige Substanzen angesehen.

Bei der Gefriertrocknung von Resorbaten hingegen wurden etwa 70 % der eingesetzten Radioaktivität im Unterstand wiedergefunden; nur etwa 30 % der durch HPLC als Metaboliten charakterisierten Fraktion waren bei der Gefriertrocknung flüchtig.

a) Messung von Formaldehyd

Gebildetes Formaldehyd wurde in Perfusaten PB-induzierter Ratten mit dem kolorimetrischen Nachweis nach Nash (1953) als Diacetyl-dihydroxy-lutidin nachgewiesen. Bei einer für die Perfusion eingesetzten NBzMA-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ wurden mit diesem Test 3 nmol/ml Formaldehyd gemessen. Dieser Wert betrug jedoch nur das Doppelte der Nachweisgrenze von 1,5 nmol, so daß große Meßungenauigkeiten möglich waren.

Bei geringeren NBzMA-Konzentrationen (weniger als 100 $\mu\text{mol/l}$) wurden weniger als 1,5 nmol Metaboliten gebildet, so daß die gebildeten Formaldehydmengen in jedem Fall zu gering waren, um mit dem kolorimetrischen Test direkt nachgewiesen zu werden (vgl. die gebildeten Metabolitenmengen bei Perfusion von Jejunum- und Ileumsegmenten mit niedrigen NBzMA-Konzentrationen, Tab. III und IV im Anhang).

b) Messung von Ameisensäure

Die durch Weiteroxidation aus Methanol und Formaldehyd entstandene Ameisensäure ist nur bei saurem pH-Wert flüchtig. Zur Isolierung der Ameisensäure wurde daher nach der Einengung eines Perfusats auf 10 % des Ausgangsvolumens (zur Entfernung von Methanol und Formaldehyd) der Destillationsrest mit Schwefelsäure stark angesäuert. Bei der weiteren Destillation dieses sauren Perfusates trat keine weitere, bei neutralem pH-Wert absorbierbare Radioaktivität mehr über. Dieses Ergebnis machte die Existenz von Ameisensäure als Metabolit unwahrscheinlich.

Weiterhin wurde versucht, saure Metaboliten wie Benzoesäure und Ameisensäure an Anionenaustauscherharz (Diethylaminoethylcellulose) zu binden. Diese Säuren lassen sich nach Bindung an Anionen-

austauscher durch anschließende Elution mit 0,1 n HCl-Lösung spezifisch wiedergewinnen. Auch durch dieses Verfahren konnte jedoch keine Ameisensäure als Metabolit nachgewiesen werden.

c) Messung von Benzylmethylamin

Durch Abspaltung der Nitrosogruppe (Denitrosierung) kann aus NBzMA das sekundäre Amin Benzylmethylamin gebildet werden. Dieses Amin kann unter neutralen pH-Bedingungen an Kationenaustauscherharz (Carboxymethylcellulose) adsorbiert und anschließend durch Waschen mit 0,1 n NaOH-Lösung eluiert werden. Nach der Chromatographie eines Perfusates an Carboxymethylcellulose erfolgte jedoch eine vollständige Elution der gesamten Radioaktivität bereits mit der wäßrigen Phase. Dies wurde durch die Bilanz der Radioaktivität, durch HPLC-Chromatographie des Eluats und durch Nachwaschen der Kationenaustauschersäulen mit 0,1 n NaOH-Lösung bestätigt.

Während der Perfusion von PB-induzierten Rattenjejenumsegmenten wurden größere Mengen Metaboliten gebildet, die bei der Gefrier-trocknung flüchtig waren. Im Perfusat entsprach diese Metabolitenfraktion zwei Dritteln der Gesamtmetaboliten, im Resorbat noch einem Drittel. Unter diesen flüchtigen Metaboliten befand sich kein CO_2 , wie die fehlende Absorption von Radioaktivität durch $\text{Ba}(\text{OH})_2$ zeigt, oder Ameisensäure, wie durch fehlende Absorption an Anionenaustauscherharz gezeigt wurde. Auch Benzylmethylamin, daß durch Denitrosierung entstehen konnte, wurde nicht gefunden. Dagegen war Formaldehyd in Perfusatproben bei hoher NBzMA-Konzentration nachweisbar. Eine mengenmäßige Angabe war jedoch wegen der geringen Substanzmengen nicht möglich.

4.4.3. Nachweis von konjugierten Metaboliten

a) durch HPLC-Chromatographie

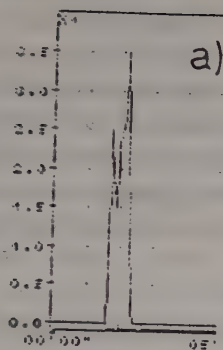
Durch HPLC-Chromatographie unter Zusatz von Essigsäure oder Trichloressigsäure (TCA) zum Laufmittel kann die Retentionszeit

Abbildung 10

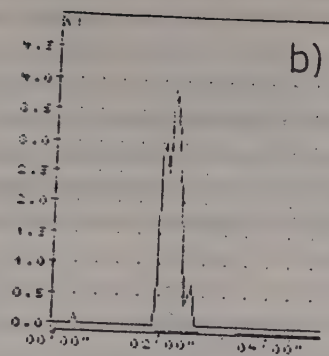
Rechromatographie von NBzMA-Metaboliten

Durch Flüssigkeitschromatographie an C 18-Bond Elut-Kartuschen wurden NBzMA-Metabolitenfraktionen isoliert und durch Gefrier-trocknen und Wiederauflösen in Wasser konzentriert. Anschließend wurde die Metabolitenfraktion in mehrere Aliquote aufgeteilt und unter Zusatz von steigenden Mengen Trichloressigsäure zum Laufmittel rechromatographiert.

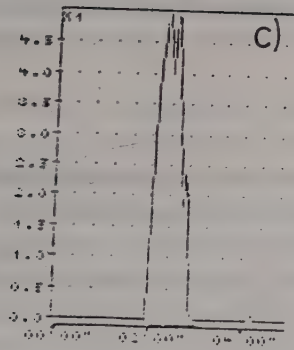
Aufgegeben wurden je 200 µl Metabolitenlösung mit einer Proben-aufgabeschleife, die Elution erfolgte isokratisch mit Wasser ohne weiteren Zusatz (Chromatogramm 10a, Kontrolle), unter Zusatz von 0,025 % TCA (Chromatogramm 10b), unter Zusatz von 0,05 % TCA (Chromatogramm 10c) und unter Zusatz von 0,1 % TCA (Chromatogramm 10d). Man beachte die in den einzelnen Chromatogrammen unterschiedliche maximale Peakhöhe (Abszisse in Zerfällen pro Minute).



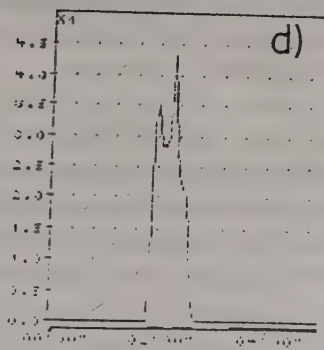
Kontrolle



0,05 % TCA



0,025 % TCA



0,1 % TCA

von Glukuroniden, Galaktosiden und Sulfatkonjugaten verlängert werden (Merrick und Selkirk, 1985). Deshalb wurden durch Gefrier-trocknung und Wiederauflösen konzentrierte Metabolitenfraktionen hergestellt und diese Metabolitenfraktionen unter Zusatz von Essigsäure oder TCA zum Laufmittel rechromatographiert.

Bei der Rechromatographie der Metabolitenfraktion an C 18-reversed phase-Material mit Wasser als Laufmittel wurde nur der Metabolitenpeak wiedererhalten. Im Chromatogramm waren zwei getrennte Peaks zu erkennen, deren Retentionszeit sich jedoch nur um etwa 15 Sekunden unterschied (siehe Abb. 10a, Kontrollchromatogramm).

Der Zusatz von 0,025 % TCA zum Laufmittel verlängerte die Retentionszeit für den gesamten Metabolitenpeak um etwa 30 Sekunden. Auch wurde der Peak etwas breiter und andeutungsweise in drei Einzelpeaks aufgetrennt (Abbildung 10b). Der Zusatz von 0,05 % und 0,1 % TCA (Abbildung 10c und 10d) führte zu keiner weiteren Verbesserung der Auflösung. Die Retentionszeit wurde wieder etwas kürzer und auch die angedeutete Trennung in drei Peaks wurde wieder schlechter, so daß bei Zusatz von 0,1 % TCA zum Laufmittel wieder nur zwei Peaks zu erkennen waren. Auch der Zusatz von Essigsäure statt TCA zum Laufmittel führte zu keiner besseren Trennung des Metabolitenpeaks.

Die Verlängerung der Retentionszeit durch Zugabe von TCA zum Laufmittel und die angedeutete Auftrennung des Metabolitenpeaks in drei unterscheidbare Einzelpeaks deutete darauf hin, daß in der Fraktion der nicht flüchtigen Metaboliten Konjugate von NBzMA-Metaboliten mit Glukuronsäure, Sulfat, Gluthation enthalten waren.

b) durch Dünnschichtchromatographie

Zur besseren Auftrennung polarer Substanzen wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Bei Verwendung von Kieselgel F 60 als stationärer Phase werden polare Substanzen fest adsorbiert; die Auftrennung erfolgt dann über die unterschiedliche

Löslichkeit in der unpolaren mobilen Phase. Hierbei sind also wegen der sehr festen Bindung nur kleine R_F -Werte für polare Substanzen zu erwarten.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Metabolitenlösungen aus Perfusatproben eingesetzt, die durch Chromatographie an Bond-Elut-Kartuschen vom NBzMA abgetrennt und durch Gefriertrocknung und anschließende Wiederauflösung in Wasser konzentriert worden waren. Diese Metabolitenlösung ergab nach der Dünnschichtchromatographie nur einen einzigen Radioaktivitätspeak, dessen Peakmaximum bei einem R_F -Wert von etwa 0,05 lag. Dieser Metabolitenpeak konnte auch durch Verlängerung der Entwicklungszeit und einer dadurch vergrößerten Laufstrecke nicht in mehrere Peaks aufgetrennt werden.

Bei der Dünnschichtchromatographie mit dem hydrophilen Kieselgel F 60 als stationärer Phase verhielten sich die Metaboliten als extrem hydrophile Substanzen mit einer sehr festen Bindung an die polare, stationäre Phase. Dies entsprach dem Bindungsverhalten der Metaboliten bei der HPLC-Chromatographie. Eine weitergehende Auftrennung der Metabolitenfraktion durch die Dünnschichtchromatographie konnte nicht erreicht werden.

c) Enzymatische Spaltung durch Glukuronidase und Galaktosidase

Unter der Annahme, daß während der Metabolisierung von NBzMA durch die Darmsegmente Glukuronid- und Sulfataddukte gebildet wurden, wurden die nicht flüchtigen Metaboliten mit spaltenden Enzymen inkubiert. Durch Glukuronidase und Sulfatase wurden die entsprechenden Addukte in Glukuronsäure bzw. Sulfat und die hieran gekoppelten Metaboliten zerlegt. Diese konnten durch Dünnschichtchromatographie aufgrund ihrer nun veränderten chromatographischen Eigenschaften nachgewiesen werden.

Für die Spaltungsversuche wurden gefriergetrocknete, konzentrierte Metabolitenlösungen aus Perfusaten verwendet. Die Proben wurden halbiert und einer Hälfte das Enzym (1000 Fishman-Einheiten/ml Glukuronidase bzw. Galaktosidase) zugesetzt. Dadurch wurden in

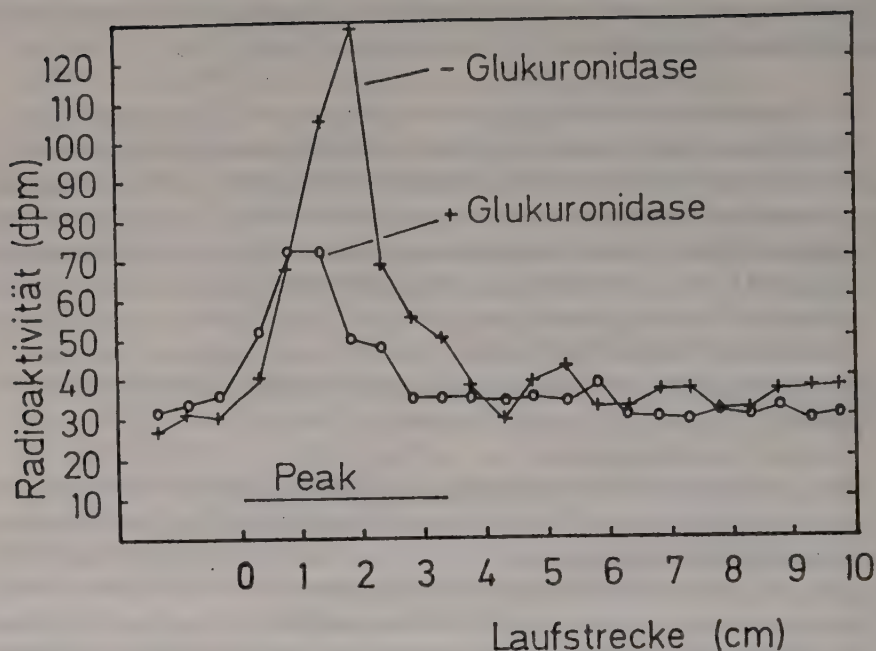


Abbildung 11

Spaltung von NBzMA-Metaboliten durch Glukuronidase

Durch Chromatographie an C 18-Bond Elut-Kartuschen isolierte und durch Gefriertrocknung aufkonzentrierte Metabolitenfraktionen aus Perfusaten wurden halbiert. Eine Hälfte wurde wie unter Methoden beschrieben mit Glukuronidase inkubiert, während die zweite Hälfte in gleicher Weise ohne Glukuronidase-Zusatz behandelt wurde. Beide Proben wurden parallel auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen und entwickelt.

Nach der Entwicklung und Trocknung der Platten wurde das Kieselgel in 0,5 cm breiten Streifen abgeschabt und die in den einzelnen Streifen enthaltene Radioaktivität gemessen. Aufgetragen wurden die in den einzelnen Proben gemessenen Zerfälle der mit Glukuronidase inkubierten Probe (0-0-0-0-0-0) sowie der Kontrollprobe (x-x-x-x). Zur Quantifizierung der Peakflächen wurden die Zählwerte um unspezifische Zerfälle (Nullwert etwa 30 dpm) bereinigt und die zu einem Peak gehörenden Meßwerte (in der Abbildung durch einen Balken markierte Proben) addiert.

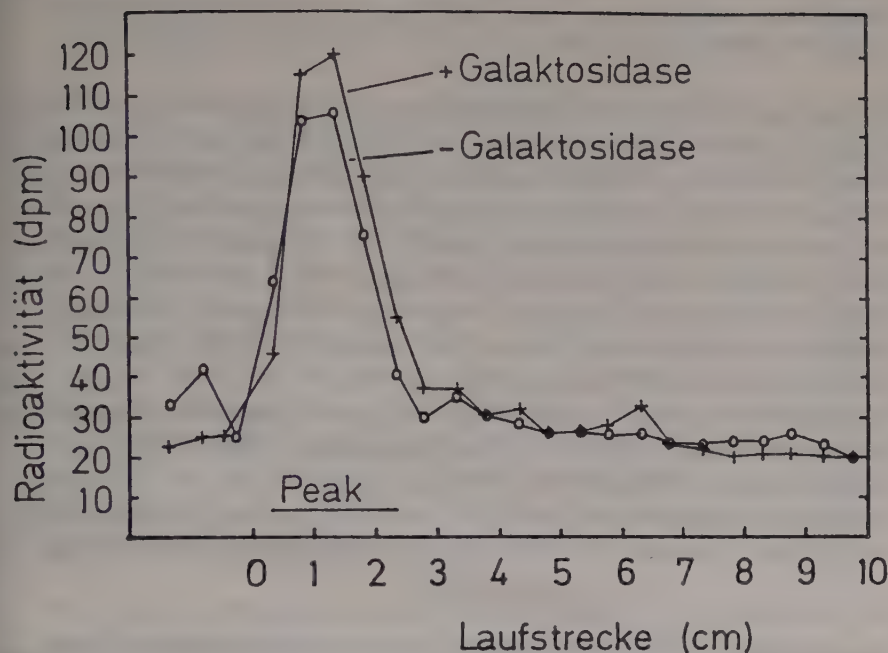


Abbildung 12

Spaltung von NBzMA-Metaboliten durch Galaktosidase

Durch Chromatographie an C 18-Bond Elut-Kartuschen isolierte und durch Lyophilisieren aufkonzentrierte Metabolitenfraktionen aus Perfusaten wurden halbiert. Eine Hälfte wurde wie unter Methoden beschrieben mit Galaktosidase inkubiert, während die zweite Hälfte in gleicher Weise, aber ohne Galaktosidase-Zusatz behandelt wurde. Beide Proben wurden parallel auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen und entwickelt. Nach der Entwicklung und Trocknung der Platten wurde das Kieselgel in 0,5 cm breiten Streifen abgeschabt und die in den einzelnen Streifen enthaltene Radioaktivität gemessen. Aufgetragen wurden die in den einzelnen Proben gemessenen Zerfälle der mit Galaktosidase inkubierten Probe (0-0-0-0-0-0) sowie der Kontrollprobe (x-x-x-x). Zur Quantifizierung der Peakflächen wurden die Zählwerte um unspezifische Zerfälle (Nullwert etwa 30 dpm) bereinigt und die zu einem Peak gehörenden Meßwerte (in der Abbildung durch einen Balken markierte Proben) addiert.

einer Hälfte die entsprechenden Addukte in die Ausgangssubstanzen gespalten, während die zweite Hälfte, die identisch behandelt wurde, als Kontrolle diente.

In der Abbildung 11 sind die beiden Chromatogramme mit bzw. ohne Spaltung der Glukuronidaddukte dargestellt. Wie man in der Abbildung 11 erkennt, erhielt man nach der Inkubation der Metabolitenlösung mit Glukuronidase/Sulfatase eine Verkleinerung der Peakfläche gegenüber der Kontrollprobe. Die Integration der Peakflächen für die Kurven mit und ohne Zusatz von Glukuronidase ergab, daß der Radioaktivitätsgehalt des Metabolitenpeaks von 378 dpm (Summation aller Zerfallswerte des Metabolitenpeaks) bei der Kontrollprobe auf 190 dpm nach Spaltung der Glukuronide abnahm, also um etwa die Hälfte. Daneben trat keine neue radioaktiv markierte Bande auf. Dafür wurde in diesen Versuchen im Laufmittel eine größere Menge Radioaktivität wiedergefunden, die die Differenz der beiden Peakflächen erklärte. Die nicht durch Glukuronidase gespaltenen Metaboliten erschienen weiterhin bei einem R_f -Wert von 0,05, wie in der Kontrollprobe.

Die Inkubation mit Galaktosidase, einem Enzym, welches Galaktoseverbindungen mit Proteinen, Zuckern und Lipiden spaltet, erzeugte keine Abnahme des Metabolitenpeaks. Die Fläche unter den Metabolitenpeaks war mit 280 dpm bei der Kontrolle bzw. 307 dpm nach Zugabe von Galaktosidase gleich groß. Auch fand sich in diesen Versuchen im Laufmittel keine Radioaktivität.

Die Spaltung eines Teils der nicht flüchtigen Addukte durch Glukuronidase zeigte, daß unter den nicht flüchtigen Metaboliten offenbar Glukuronsäureaddukte enthalten waren. Unter der Annahme einer vollständigen Spaltung aller vorhandenen Glukuronide waren etwa 50 % der nicht flüchtigen Metaboliten Glukuronsäureaddukte. Der radioaktiv markierte Metabolitenanteil der Glukuronsäureaddukte wurde unter den Bedingungen der Dünnschichtchromatographie nicht als Substanzbande, sondern im Laufmittel wiedergefunden, er zeichnete sich durch eine erhöhte Flüchtigkeit aus. Dagegen ergaben sich keine Hinweise auf Galaktoseaddukte.

4.4.4 Nachweis von Metaboliten mit intakter Nitrosfunktion

Durch Hydroxylierung am aromatischen Ring der Benzylgruppe können stabile Metaboliten entstehen, die noch eine intakte Nitrosfunktion enthalten (siehe Reaktionsmöglichkeiten im Schema der Abb. 14). Zum Nachweis dieser Substanzen wurden alle in einer Resorbatprobe enthaltenen Metaboliten durch Chromatographie an Bond - Elut-Kartuschen isoliert, gefriergetrocknet, in Methanol wieder aufgelöst und nach Methylierung der Hydroxidgruppen mit Methyljodid durch gaschromatographische Trennung und Substanznachweis durch Thermo-Energie-Analyse (TEA) untersucht (Durchführung Dipl. Chem. W. Zwickenpflug, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie). Durch diese Nachweismethode wurden nur Substanzen erfaßt, die noch eine intakte Nitrosfunktion enthalten; alle Spaltprodukte des NBzMA ohne Nitrosfunktion wurden durch den Thermo-Energie-Analysator nicht erkannt.

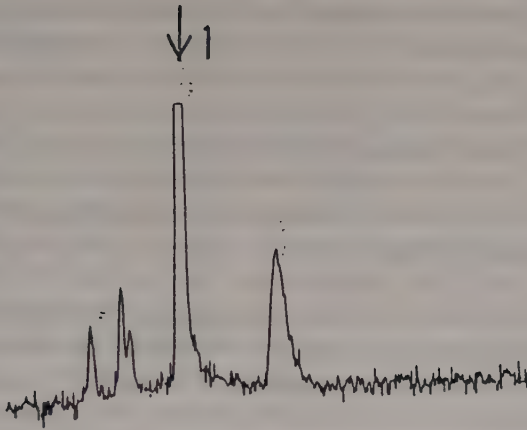
Wie aus den Chromatogrammen der Abbildung 13 zu entnehmen ist, wurde in Resorbatproben neben NBzMA mit einer Retentionszeit von 11 min ein weiterer Peak bei einer Retentionszeit von etwa 16 min gefunden. Dieser Peak enthielt gleichviel Substanz, wie auch an mitgeschlepptem NBzMA in der Probe noch vorhanden war. In einzelnen Chromatogrammen traten neben den beiden Peaks bei 11 min und 16 min weitere, kleinere Peaks auf mit Retentionszeiten zwischen 7 min und 10 min.

Die insgesamt im Thermo-Energie-Analysator-Spektrum wiedergefundenen Substanzmengen waren sehr gering. Obwohl keine Quantifizierung durchgeführt worden war, ließ sich doch sagen, daß die hier nachgewiesenen Substanzmengen weniger als 1 % der insgesamt gebildeten Metaboliten ausmachten. Für eine genauere Charakterisierung des im TEA-Chromatogramm nachgewiesenen Metabolitenpeaks bei 16 min Retentionszeit reichten die Substanzmengen nicht aus. Wahrscheinlich entsprach dieser Peak einem Gemisch von Substanzen, die an der Benzylgruppe hydroxyliert worden waren.

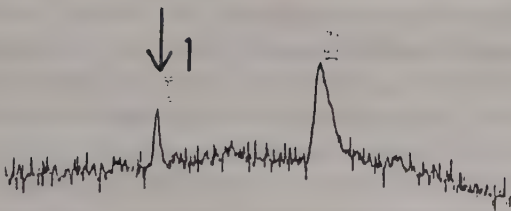
Abbildung 13

Nachweis von Metaboliten mit intakter Nitrosofunktion durch Gaschromatographie

Die in einer Resorbatprobe enthaltenen Metaboliten wurden durch Gefriertrocknung konzentriert, die freien Hydroxidgruppen methyliert und die erhaltene Metabolitenlösung durch Gaschromatographie aufgetrennt. Die Detektion von Substanzen erfolgte durch Thermo-Energie-Analyse (spezifisch für die Nitrosofunktion). Im Chromatogramm war NBzMA bei einer Retentionszeit von 11 Minuten nachweisbar (Pfeil 1). Die weiter auftretenden Peaks enthielten Metaboliten bisher unbekannter Struktur.



Resorbat insgesamt



Resorbat lyophilisiert

4.4.5 Nachweis gebundener Radioaktivität

Nach der Hydroxylierung von NBzMA an der Methylengruppe des Benzylrestes und dem Zerfall des hierbei entstehenden Halbaminals bildet sich intermediär ein sehr reaktives Carbeniumion aus der Methylgruppe. Die Weiterreaktion dieses Carbeniumions mit dem Lösungsmittel Wasser führt zur Bildung von Methanol, die Reaktion mit der in großen Mengen vorhandenen Glukose zur Bildung von Glukoseaddukten. Daneben besteht aber auch die Möglichkeit der Reaktion mit Proteinen oder der DNA, was zur Bildung von sogenannter gebundener Radioaktivität führt.

Diese an Proteine oder an die DNA gebundene Radioaktivität konnte durch Isolierung der Proteine bzw. der DNA und die Bestimmung der in diesen Fraktionen enthaltenen Radioaktivität gemessen werden. Für die Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität wurden die Proteine mit verschiedenen Methoden (2 % TCA, 1 N HClO₄, Ba(OH)₂ + ZnSO₄) isoliert. Die Wahl der Methode hatte dabei keinen Einfluß auf das Meßergebnis.

a) Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität

Die Bestimmung von proteingebundener Radioaktivität in Perfusatproben ergab erwartungsgemäß, daß im Perfusat keine proteingebundene Radioaktivität nachweisbar war, da der Proteingehalt des Perfusats vernachlässigbar gering war. In Resorbaten wurden bei niedrigen NBzMA-Konzentrationen, d.h. bei einer hohen Metabolisierungsrate des NBzMA, etwa 250 - 500 dpm = 0,01 % der Gesamtradioaktivität als Protein-assoziierte Radioaktivität gemessen. Mit steigender NBzMA-Konzentration nahm der prozentuale Anteil der proteingebundenen Radioaktivität rasch auf nicht mehr meßbare Werte ab. Auch in Mucosahomogenaten betrug der Anteil der Protein-assoziierten Radioaktivität maximal 0,05 % der applizierten Dosis (bei 1 μ mol/l NBzMA und 45 % Metaboliten im Mucosahomogenat); auch hier nahm die Bindung an Protein mit steigender NBzMA-Konzentration rasch ab (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Proteinbindung machte also nur einen sehr geringen Anteil des metabolisierten NBzMA aus und überschritt auch in Mucosahomogenaten nicht 2 % der insgesamt als Metaboliten charakterisierten Radioaktivitätsmenge.

b) Bestimmung der DNA-gebundenen Radioaktivität

Bei der Untersuchung der DNA-assozierten Radioaktivität wurden in allen untersuchten Proben nur sehr geringe Radioaktivitätswerte (maximal 400 dpm bei der Aufarbeitung der Mucosa eines kompletten Darmsegmentes) gefunden. Sie betrugen damit maximal 0,003 % der Gesamtdosis. Bei höheren NBzMA-Konzentrationen nahm die DNA-Bindung auf nicht mehr meßbare Werte ab (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei der Perfusion von Jejunumsegmenten von mit PB induzierten Ratten fand sich nur ein sehr geringer Anteil der Radioaktivität an Proteine oder DNA gebunden wieder.

5. Diskussion

5.1 Methodisch-kritische Vorbemerkungen

In der vorliegenden Arbeit wird die Aufnahme und der präsystemische Stoffwechsel von N-Nitrosobenzylmethylamin (NBzMA) durch die Ratte mit dem Modell der isoliert perfundierten Darmschlinge untersucht. Dieses Modell ist in unserer Arbeitsgruppe bereits für die Untersuchung der Aufnahme und Metabolisierung von N-Nitrosodiethylamin, N-Nitrosodipropylamin, N-Nitrosodibutylamin, N-Nitrosodiamylamin und N-Nitroso-tert.-butylmethylamin verwendet worden (Richter-Cooberg, 1984; Federsel, 1985; Neiss, 1985; Richter, 1986; Richter et al., 1986). Für die Untersuchungen wurden Jejunum- und Ileumsegmente weiblicher Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Für diese Darmsegmente sind bei der Entwicklung der Ganzglas-Apparatur die Vitalitätskriterien genau charakterisiert worden (Richter und Strugala, 1985).

Als Vitalitätskriterien werden funktionelle Parameter herangezogen (Parsons, 1967) wie die Wasserverschiebung von der mucosalen zur serosalen Seite (bei Jejunumsegmenten 0,1 ml/cm/h, bei Ileumsegmenten 0,05 ml/cm/h), der Bergauftransport von Glucose in Jejunumsegmenten (Konzentrierung im Resorbat auf die drei- bis vierfache Perfusatkonzentration) und das Serosa-Mucosa-Verhältnis von Na^+ , K^+ und Ca^{++} (S/M-Quotienten für Na^+ 0,9 - 1, für K^+ 0,8 - 0,9 und für Ca^{++} 0,4 - 0,6). Entsprechend diesen Werten wurden Einzelperfusionen, bei denen die obigen Parameter von den Normalwerten abweichen, nicht in die Auswertung einbezogen.

Durch NBzMA-Zusatz zum Perfusat in Konzentrationen von 0,3 bis 500 $\mu\text{mol/l}$ (maximal 45 mg/kg Körpergewicht) werden die Vitalitätsparameter gegenüber den Kontrollwerten nicht signifikant verändert, obwohl diese Dosis wesentlich über der oralen LD_{50} -Dosis von 18 mg/kg Körpergewicht liegt. Ebenso wenig hat die Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren einen signifikanten Einfluß auf die Vitalität der Darmsegmente. Dies entspricht den bereits bei N-Nitrosodiethylamin, N-Nitrosodipro-

pylamin und N-Nitrosodibutylamin gefundenen Ergebnissen, daß der Zusatz dieser Nitrosamine im Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 000 $\mu\text{mol/l}$ keine Beeinflussung des Flüssigkeitstransports, des Elektrolyttransports und des Glukosetransports bewirkt (Richter-Cooberg, 1984; Richter und Strugala, 1985; Federsel, 1985).

5.2 Aufnahme von NBzMA durch Rattendarmsegmente

Das Ösophaguskarzinogen NBzMA ist in China in der Provinz Linxian, einem Inzidenzgebiet mit einem gegenüber der normalen Inzidenz 35-fach erhöhten Vorkommen von Ösophaguskrebs, in der Nahrung nachgewiesen worden. Höhere Konzentrationen sind insbesondere in Mais (bis zu 1 $\mu\text{g/kg}$), in Rettich (bis zu 0,2 $\mu\text{g/kg}$), in gesalzenen Gemüsen (0,2 $\mu\text{g/kg}$) und in Reissuppen (0,2 $\mu\text{g/kg}$) gefunden worden. Diese Mengen entsprechen Konzentrationen von 1 - 10 nmol/kg Lebensmittel (Li et al., 1985).

Insbesondere in Mais und Rettich nimmt mit zunehmender Lagerungszeit der Nahrungsmittel sowohl die Anzahl der kontaminierten Proben als auch die gemessene Nitrosamin-Konzentration stark zu. Dies wird auf den Befall der Nahrungsmittel mit dem Schimmelpilz *Fusarium moniliforme* Sheldon zurückgeführt. Dieser Pilz besitzt, wie die ebenfalls auf Nahrungsmitteln nachgewiesenen *Penicillium*-Arten *P. cyclopium* und *P. roquefortii*, die Fähigkeit, aus Nitrit und einem sekundären Amin das entsprechende Nitrosamin in großen Mengen herzustellen (gezeigt für N-Nitrosoisoamylmethylamin, Ji et al., 1986). Dieser Weg der Nitrosaminbildung durch Pilzbefall wird als der Hauptweg für die Bildung der in Linxian gefundenen Nitrosamine angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß während der Perfusion von Rattendarmsegmenten bei NBzMA-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ im Darminhalt der größte Teil des NBzMA unverändert durch den Darm hindurch aufgenommen wird (95 % des NBzMA durch Darmsegmente von nicht induzierten Tieren, noch 50 % durch Darmsegmente von PB-induzierten Tieren). Unter den Voraussetzungen, daß die NBzMA-Aufnahme und der NBzMA-Metabolismus durch den

menschlichen Darm in gleicher Weise geschieht, ist damit zu rechnen, daß auch bei den kleineren Konzentrationen, wie sie in China in Nahrungsmitteln nachgewiesen worden sind (1 - 10 nmol/kg), der Großteil des NBzMA unverändert durch den Darm aufgenommen wird.

Wie der gemessene S/M-Quotient von etwa 0,9 zeigt, wird NBzMA nicht auf der serosalen Darmseite angereichert wie Aminosäuren oder Zucker. Dies gilt auch für die übrigen, bisher untersuchten Nitrosamine (vgl. Tabelle 4). So wird für N-Nitrosodiethylamin ein S/M-Quotient von 1,0 gemessen, für N-Nitrosodipropylamin von 0,9 und für N-Nitrosodibutylamin von 0,2. Dabei fällt der S/M-Quotient für nicht metabolisierte Substanz mit steigender Lipophilie des Nitrosamins (gemessen als Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient). NBzMA fügt sich zwanglos in diese Reihe der symmetrischen Nitrosamine ein. Alle diese Nitrosamine werden aufgrund des Konzentrationsgefälles zwischen dem Darminhalt und der Mucosazellen in die Mukosa aufgenommen.

Anders als das NBzMA werden die gebildeten NBzMA-Metaboliten auf der Serosaseite angereichert. Eine gleichartige Anreicherung ist für die Metaboliten des N-Nitrosodipropylamins und des N-Nitrosodibutylamins beschrieben worden (Richter-Cooberg, 1984; Neiss, 1985; Federsel, 1985; Richter, 1986; Richter et al., 1986). Für die Metaboliten dieser Substanzen ist der Konzentrierungseffekt allerdings wesentlich größer, der S/M-Quotient beträgt für NDPA-Metaboliten 4,4, für NDBA-Metaboliten sogar 8,1. Allerdings werden NDPA und NDBA in einem wesentlich höheren Ausmaß verstoffwechselt, als dies für NBzMA der Fall ist.

Auch für Ileumsegmente wird gefunden, daß NBzMA nicht aktiv angereichert wird. So wird für NBzMA ein S/M-Quotient nahe 1 gemessen, er unterscheidet sich nicht von dem für NDPA gemessenen S/M-Quotienten. Der für NDBA gefundene Wert von 0,36 ist aber wesentlich kleiner als 1. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch den hohen Umsatz des NDBA zu Metaboliten auch durch Ileumsegmente.

Tabelle 4:

Vergleich der S/M-Quotienten für Nitrosamine und deren Metaboliten

In Jejunum- und Ileumsegmenten weiblicher Ratten wurde der S/M-Quotient für die eingesetzten Nitrosamine und für die aus diesen gebildeten Metaboliten bestimmt. Die Daten für N-Nitroso-diethylamin, N-Nitrosodipropylamin und N-Nitrosodibutylamin sind Richter-Cooberg, 1984, entnommen (verwendete Konzentrationen 0,5 - 1 $\mu\text{Mol/l}$).

Nitrosamin	S/M Gesamt- radioaktivität	S/M Metaboliten	S/M Original- substanz	Vertei- lungskoeff.
------------	-------------------------------	-----------------	---------------------------	------------------------

Jejunum

NDEA	1,0	n.b.	n.b.	0,53
NBzMA	0,94	2,8	0,92	6,2
NDPA	1,8	4,4	0,9	9,3
NDBA	3,16	8,1	0,15	117

Ileum

NDEA	0,93	n.b.	n.b.	0,53
NBzMA	0,91	n.b.	0,91	6,2
NDPA	1,09	1,79	0,99	9,3
MDBA	1,3	4,7	0,36	117

n.b. nicht bestimmt

Diese Ergebnisse werden qualitativ unverändert auch nach Phenobarbital-Induktion gefunden. Aufgrund des höheren Umsatzes von NBzMA zu Metaboliten sinkt der für unverändertes NBzMA gemessene S/M-Wert von 0,91 auf 0,5 - 0,6 ab. Der für die Metaboliten gefundene Wert wird auch nach Phenobarbital-Induktion mit etwa 2,5 unverändert gemessen.

5.3. NBzMA-Metabolismus

NBzMA wird durch Jejunumsegmente und in geringem Maße auch durch Ileumsegmente weiblicher Ratten metabolisiert. Dabei werden die größten Umsätze von NBzMA zu Metaboliten nach Ölvorbehandlung oder Phenobarbital-Induktion der Ratten erhalten. In allen Fällen werden stark hydrophile Metaboliten gebildet. Sie eluieren in der HPLC als ein Peak; durch hydrophobes C 18-reversed phase-Säulenmaterial werden keine Metaboliten zurückgehalten.

Wie aus der chemischen Formel des NBzMA und dem Metabolisierungsschema für NBzMA durch alpha-Hydroxylierung (siehe Abbildung 14) zu ersehen ist, kann prinzipiell nur eine begrenzte Anzahl radioaktiv markierter Metaboliten entstehen, die im Radiochromatogramm gemessen werden.

Von diesen prinzipiell möglichen Metaboliten, die aus der ^{14}C -Methylgruppe durch alpha-Oxidation entweder an der Methylgruppe (rechter Weg) oder an der Benzylgruppe (linker Weg) gebildet werden, wird nur CO_2 durch Auswaschen aus dem Gasstrom direkt nachgewiesen. Dabei werden nur etwa 5 % der als Metaboliten charakterisierten Radioaktivität bzw. 0,5 - 1 % der insgesamt eingesetzten Radioaktivität (bei 1 μmol NBzMA) als CO_2 wiedergefunden. Dieser Wert entspricht dem für NDBA gefundenen Ergebnis, daß 1 - 2 % der Gesamtradioaktivität als CO_2 gemessen werden (Jejunumsegmente nicht induzierter Ratten). Wegen des höheren Metabolismus von NDBA durch Rattenjejunumsegmente werden demnach auch hier nur etwa 3 - 5 % der insgesamt gebildeten Metaboliten als CO_2 identifiziert (Neiss, 1985).

Formaldehyd, entweder direkt gebildet durch Hydroxylierung der Methylgruppe oder indirekt gebildet als Oxidationsprodukt des Methanols, ist qualitativ als Metabolit im Perfusat nachweisbar; eine quantitative Bestimmung des gebildeten Formaldehyds ist mit der kolorimetrischen Methode (Nash, 1953) bei den untersuchten geringen NBzMA-Konzentrationen nicht möglich; durch HPLC-Chromato-

graphie gelingt die Trennung von Formaldehyd von den übrigen gebildeten Metaboliten nicht, so daß bisher eine quantitative Messung von Formaldehyd bei den geringen gebildeten Mengen nicht möglich war. Formaldehyd ist als Metabolit auch bei der Inkubation von Mikrosomen mit NBzMA nachweisbar. So wird Formaldehyd durch Lebermikrosomen (eingesetzt 16,7 μ mol NBzMA; Labuc und Archer, 1982; Mehta et al., 1984) und bei der hohen Konzentration von 5 mmol/l auch durch Ösophagusmikrosomen gebildet (Labuc und Archer, 1982; Mehta et al., 1984). Auch nach intravenöser Gabe wurde Formaldehyd als Metabolit gefunden (eingesetzt 2,5 mg/kg KG NBzMA; Hodgson et al., 1980).

Methanol und Ameisensäure sind ebenfalls wegen der geringen absoluten Metabolitenmengen nicht direkt nachweisbar. Die Bildung von Methanol als NBzMA-Metabolit ist jedoch sehr wahrscheinlich. So ist Methanol bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen nach in vivo-Gabe großer NBzMA-Dosen (2,5 mg/kg Körpergewicht) als NBzMA-Metabolit identifiziert worden (vgl. Tabelle 5; Hodgson et al., 1980; Kouros et al., 1983; Wiestler et al., 1984). Ameisensäure ist in vivo ebenfalls als Metabolit identifiziert worden. Sie ist vom Darm jedoch während der Perfusion wahrscheinlich nicht gebildet worden, wie die fehlende Adsorption von Radioaktivität an Anionenaustauscherharz und die fehlende Flüchtigkeit unter sauren Bedingungen nahelegen. Ob Ameisensäure bei in vitro-Experimenten mit Leber- und Ösophagusmikrosomen als Metabolit nicht entstanden ist, oder ob diese Substanz nur wegen der schlechten Nachweismöglichkeiten nicht bestimmt worden ist, ist der Literatur nicht zu entnehmen (Labuc und Archer, 1982; Mehta et al., 1984).

Von den flüchtigen Metaboliten kann eine zweite, radioaktiv markierte, nicht flüchtige Fraktion abgetrennt werden. Diese Metaboliten verhalten sich ebenfalls als extrem polare Substanzen, die bei der HPLC-Chromatographie von unpolarem Säulenmaterial nicht zurückgehalten werden können und nach dem Gefriertrocknen in organischen Lösungsmitteln nicht löslich sind. In der Dünn-

Tabelle 5

Bisherige Untersuchungen zum Stoffwechsel von NBzMA

Spezies	Dosis	Ergebnisse
Ratte	16 μ mol-5 mmol	Tumoren des Pharynx und Ösophagus (Bürkle et al., 1984)
	2,5 mg/kg KG intravenös	DNA-Methylierung Ösophagus > Leber > Lunge > Vormagen Metaboliten in vivo Methanol, Formaldehyd, Ameisensäure (Hodgson et al., 1980; Kouros et al., 1983; Wiestler et al., 1984)
	2,5 mg/kg KG oral	DNA-Methylierung Ösophagus > Leber > Vormagen
	16,7 μ mol Lebermikrosomen	Metaboliten Benzylalkohol, Benzaldehyd Formaldehyd (Labuc und Archer, 1982; Mehta et al., 1984)
	5 mmol Ösophagusk mikrosomen	Metaboliten Benzaldehyd, Formaldehyd (Labuc und Archer, 1982; Mehta et al., 1984)
Maus	2,5 mg/kg KG intraperitoneal	DNA-Methylierung Leber > Lunge > Vormagen (Kleihues et al., 1981; Wiestler et al., 1984)
	2,5 mg/kg KG oral	DNA-Methylierung Ösophagus = Vormagen > Leber (Wiestler et al., 1984)
	5 mmol, Lebermikrosomen	Metaboliten Benzylalkohol > Benzaldehyd >> Benzoessäure (Mehta et al., 1984)
	5 mmol, Lunge, Niere	Metaboliten Benzylalkohol > Benzaldehyd (Mehta et al., 1984)
Wüstenspringmaus	2,5 mg/kg KG subcutan	DNA-Methylierung Lunge >> Leber = Ösophagus (Wiestler et al., 1984)

schichtchromatographie absorbieren sie dagegen extrem fest an einer polaren stationären Phase. Ein Teil dieser Fraktion besteht aus Glukuronsäureaddukten. Bei der Spaltung mit Glukuronidase werden leicht flüchtige Metaboliten freigesetzt, die im Laufmittel wiedergefunden werden.

Die Entstehung dieser Addukte ist erklärbar über die Oxidation an der Benzylgruppe und anschließender Addition des entstehenden Carbeniumions an die als Nährsubstrat in großen Mengen verfügbare Glukose (siehe Abbildung 14). Daneben existiert auch die Möglichkeit einer spezifischen Bildung von Glukuronsäureaddukten durch die UDP-Glukuronyltransferase. Dieser Stoffwechselweg ist in vielen Organen (Borghoff und Birnbaum, 1985) und für eine Vielzahl von Fremdstoffen wie Morphin, Östradiol oder Salizylamid nachgewiesen (Koster und Noordhoek, 1983; Stevens et al., 1986); für einige Substanzen wie Morphinum ist die präsystemische Glukuronidierung ein bevorzugter Stoffwechselweg (Pacifci et al., 1986). Dabei kann die Glukuronidierung ein Entgiftungs- und Ausscheidungsweg sein, sie kann aber auch zu einer Verstärkung der Toxizität führen (Stevens et al., 1986). Ob die vom Darm gebildeten Konjugate der NBzMA-Metaboliten in vivo eine toxische Wirkung ausüben, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Daneben treten auch durch beta-Glukosidase nicht spaltbare Produkte auf, deren Natur noch nicht geklärt ist. Erschwert wird die Reinigung und Trennung dieser Substanzen durch die ausgeprägte Wasserlöslichkeit, die die Extraktion aus der wäßrigen Lösung verhindern, in der die Metaboliten während der Perfusion anfallen. Dies läßt bisher eine Abtrennung und Anreicherung dieser Metabolitenfraktion sowie eine eventuelle Auftrennung in einzelne Subfraktionen nicht zu.

Weitere prinzipiell mögliche Stoffwechselwege wie die Denitrosierung zum sekundären Amin Benzylmethylamin oder die Oxidation des NBzMA am aromatischen Ring zu den entsprechenden ringhydroxylierten Produkten spielen offenbar keine Rolle, wie die vorliegenden Befunde zeigen. Weder sind ringhydroxylierte Produkte in größeren Mengen nachweisbar, noch kann Benzylmethylamin als Denitrosie-

rungsprodukt nachgewiesen werden. Auch die Befunde anderer Untersucher weisen in diese Richtung; so sind diese Metaboliten bisher noch nicht als NBzMA-Metaboliten beschrieben worden (vgl. auch Tabelle 5). Die Denitrosierung als quantitativ bedeutsamer Stoffwechselweg wird bisher auch nur für das N-Nitrosodimethylamin und das N-Nitrosodiphenylamin als Abbauweg von größerer Bedeutung diskutiert (Appel et al., 1984); für die längerkettigen Nitrosamine NDPA, NDBA und NDAA hat die Denitrosierung während der Perfusion mit Rattendarmsegmenten offenbar keine Bedeutung (Richter et al. 1986a).

Das in Abbildung 14 wiedergegebene Abbauschema des NBzMA nach primärer alpha-Oxidation erklärt die Entstehung von Methanol, Formaldehyd, Ameisensäure und CO₂ aus der Methylgruppe sowie der nicht radioaktiv markierten Produkte Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoesäure aus der Benzylgruppe. Weitere, nicht in dieses Schema hineinpassende Metaboliten des NBzMA sind bisher nicht identifiziert worden; auch die Ergebnisse dieser Arbeit können durch die Bildung dieser Metaboliten vollständig erklärt werden.

Des weiteren können durch Reaktion des intermediär gebildeten Carbeniumions mit der DNA, mit Proteinen und anderen Zellbestandteilen Addukte gebildet werden. Diese Substanzen entstehen ebenfalls erst nach erfolgter alpha-Oxidation an der Benzylgruppe. Hierdurch entsteht ein chemisch instabiles Halbaminal, welches bei neutralem pH-Wert zu Benzylaldehyd und einem Methylcarbeniumion zerfällt. Dieses äußerst reaktive Carbeniumion kann anschließend mit einer Vielzahl von Zellbestandteilen reagieren und insbesondere durch Reaktion mit der DNA zur Initiierung der Karzinogenese führen (Seebach und Enders, 1975; Wiessler et al., 1986).

Diese Reaktionen, die zur Bildung von Addukten mit Proteinen und DNA führen, werden allgemein als die für die Karzinogenese ausschlaggebenden Stoffwechselschritte angesehen. Für die Nitrosamine, die ausschließlich in der alpha-Position Wasserstoffatome tragen, werden diese Stoffwechselschritte als bevorzugter Metabolisierungsweg diskutiert (Dipple et al., 1985; Koepke et al.,

1984). Bei anderen Nitrosaminen können diesem Aktivierungsschritt jedoch noch andere Stoffwechselschritte vorgelagert sein (Preussmann und Stewart, 1984; Okada und Ishidate, 1977).

Obwohl die Menge der an Proteine oder an die DNA gebundenen Radioaktivität in der Darmmukosa nur sehr gering ist, kann hieraus nicht auf eine geringe oder fehlende Bedeutung für die Karzinogenese geschlossen werden. So wird für NBzMA in vivo nur eine geringe DNA-Methylierung gefunden; die Höhe der DNA-Methylierung korreliert nicht mit der Tumorinduktion im Ganztier. Aus diesen Gründen ist es nicht ausgeschlossen, daß auch eine sehr geringe DNA-Methylierung in einzelnen Organen bereits tumorauslösend wirken kann. Diese Methylierung kann prinzipiell in allen Organen stattfinden, in denen das NBzMA aktiviert werden kann; Dünndarmtumoren sind allerdings nach NBzMA-Gabe bisher nicht beobachtet worden (Preussmann und Stewart, 1984).

5.4. Zur Induzierbarkeit des NBzMA-Stoffwechsels

Der Umsatz von NBzMA wird durch PB, aber auch bereits durch Öl stark stimuliert, durch 3-Methylcholanthren hingegen gehemmt. Gegenüber nicht induzierten Jejunumsegmenten beträgt dabei die Steigerung durch Öl 400 %. Durch PB wird dieser Induktionseffekt bei Jejunumsegmenten noch einmal verdoppelt; gegenüber nicht vorbehandelten Jejunumsegmenten wird die Umsatzgeschwindigkeit verachtacht.

Dieser Induktionseffekt von Phenobarbital auf den NBzMA-Stoffwechsel beruht auf einer Vermehrung spezifischer Cytochrom P 450-Isoenzyme. Durch Zugabe von SK&F 525 A, einem Hemmstoff von Cytochrom P 450-vermittelten Reaktionen, zum Perfusionsmedium kann dieser Induktionseffekt wieder aufgehoben werden (Netter, 1982). Die bei Zusatz von 1 mmol/l SK&F 525 A gemessene Metabolisierungsgeschwindigkeit entspricht damit der bei nicht induzierten Ratten gemessenen Geschwindigkeit. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Metabolismus von NBzMA tatsächlich überwiegend ein Cytochrom P 450 vermittelter Stoffwechselweg ist. Dabei werden die NBzMA-metabolisierenden Isoenzyme durch PB, in geringerem Ausmaß bereits durch

die Gabe von Weizenkeimöl allein, induziert. Die Zunahme des NBzMA-Stoffwechsels durch Phenobarbitalinduktion um das Achtfache entspricht dabei der von Bonkovsky et al. (1982) durch immunologische Methoden gemessenen mengenmäßigen Zunahme der PB-induzierbaren Isoenzyme im Rattendarm um das Zehnfache.

Durch Induktion mit 3-MC werden andere Cytochrom P 450-Isoenzyme induziert. Dementsprechend wird der Stoffwechsel von NBzMA durch Gabe von 3-MC nicht stimuliert. Die nach Gabe von Öl, dem Lösungsmittel auch für 3-MC, allein erreichte Stimulation wird dabei durch Zusatz von 3-MC ebenfalls wieder aufgehoben. Dies kann an der unterschiedlichen Potenz von Öl und 3-MC in Bezug auf die Induktion von Cytochrom P 450-Isoenzymen liegen.

Gleiche Effekte wie in Jejunumsegmenten werden auch bei der Perfusion von Ileumsegmenten beobachtet. Hier betragen allerdings die gemessenen Umsatzgeschwindigkeiten nur ein Fünftel der in Jejunumsegmenten gemessenen Werte. In Ileumsegmenten ist durch PB auch kein weiterer Anstieg der Metabolisierung gegenüber den bei Ölgabe gemessenen Werten mehr nachzuweisen; beide Werte sind aber gegenüber den nicht induzierten Tieren um das Achtfache erhöht. Eine mengenmäßige Angabe der durch PB in Ileumsegmenten erreichbaren Induktion der Cytochrom P 450-Isoenzyme ist in der Literatur nicht enthalten.

Die selektive Vermehrung der Konzentration einzelner Isoenzyme des Cytochrom P 450-Systems durch Induktionsmittel wie PB oder 3-MC ist besonders in der Rattenleber gut untersucht worden (Cresteil et al., 1986; Waxman und Walsh, 1982). Dabei ist dieser Effekt nicht auf die Ratte beschränkt. Auch bei anderen Spezies (Maus: Scharf und Ullrich, 1974; Mensch: Adams et al., 1985; Kaninchen: Wolf et al., 1984) wurde das PB-induzierbare Isoenzym gefunden und aus Organen dieser Spezies gereinigt und charakterisiert. PB induziert dabei in allen Spezies die als Cytochrom P 450-Isoenzyme zusammengefaßte Gruppe, während 3-MC die Isoenzyme der Cytochrom P 448-Gruppe induziert.

Auch in anderen Organen wie der Lunge (Domin et al., 1983), dem Colon (Kaku et al., 1985) und dem Dünndarm (Bonkovsky et al., 1985; Adams et al., 1985) ist dieser Effekt nachgewiesen worden. Im Dünndarm nicht induzierter Ratten sind die PB-induzierbaren Cytochrom P 450-Isoenzyme nur in geringerer Konzentration nachzuweisen (5 % der Gesamt-Cytochrom P 450-Menge), während sie durch PB-Induktion auf die Hälfte des Gesamt-Cytochrom P 450-Gehalts ansteigen (Bonkovsky et al., 1985). Dieser Anstieg auf die zehnfache Ausgangsmenge entspricht in etwa auch dem Anstieg des NBzMA-Metabolismus vor und nach PB-Induktion. Dies erklärt die Tatsache, daß der Metabolismus von NBzMA durch Dünndarmsegmente nicht induzierter Ratten nur in sehr geringem Ausmaß katalysiert wird, sehr effizient dagegen durch die Dünndarmsegmente PB-induzierter Ratten, in denen die Phenobarbital-induzierbaren Cytochrom P 450-Isoenzyme in großen Mengen vorhanden sind. Da die Induzierbarkeit dieser Isoenzyme Phenobarbital-spezifisch ist und durch 3-MC andere Isoenzyme induziert werden, die durch immunologische Methoden unterschieden werden können (Bonkovsky et al. 1985), erklärt diese Annahme ebenfalls die Tatsache, daß durch 3-MC-Induktion keine Erhöhung des Metabolismus gegenüber nicht induzierten Ratten gefunden wird.

Auch für das bisher am intensivsten erforschte N-Nitrosodibutylamin (NDBA) kann in der Ratte ebenfalls eine Phenobarbital-induzierbare alpha-Hydroxylierung nachgewiesen werden (Dipple et al., 1985; Koepke et al., 1984). Für das NDBA konnte überdies gezeigt werden, daß die drei prinzipiell möglichen Oxidationswege (omega-Hydroxylierung, omega-1-Hydroxylierung und alpha-Hydroxylierung) auch drei verschiedenen Cytochrom P 450-Isoenzymen zugeordnet werden können (Schulze und Philpot, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Vielzahl der bei NBzMA gefundenen oder wahrscheinlich gemachten Metaboliten ist zum Teil durch die Weiteroxidation der primär gebildeten Alkohole bzw. Aldehyde durch cytosolische Enzyme bedingt. Insbesondere das Methanol kann durch die mikrosomale Alkohol-Oxidase und die Alkohol-Dehydrogenase weiteroxidiert werden.

Unbeantwortet bleiben muß die Frage, ob NBzMA selbst das eigentliche karzinogene Agens ist, welches für die Induktion des Ösophaguskrebses verantwortlich ist, oder ob ein aus dem NBzMA gebildetes Folgeprodukt das eigentliche karzinogene Agens ist, wie es für das NDBA, ein Harnblasenkarzinogen, nachgewiesen wurde. Zur Beantwortung dieser Frage muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden, was mit den im Darm gebildeten Metaboliten in anderen Organen geschieht. Während Methanol, Formaldehyd, Ameisensäure oder CO_2 selbst nicht karzinogen sind, können die Addukte der NBzMA-Metaboliten sehr wohl toxische Effekte ausüben, wie es für eine Reihe von Glutathion- und Cysteinkonjugaten nachgewiesen werden konnte (Stevens et al., 1986); auch für Substanzen, die in den enterohepatischen Kreislauf eingeschleust werden, ist eine Erhöhung der Wirksamkeit durch die gebildeten Konjugate beschrieben (Pang und Gilette, 1978). Bis zur Klärung dieser Fragen, ob unverändert aufgenommenes NBzMA das eigentliche Ösophaguskarzinogen ist, oder ob ein NBzMA-Metabolit für die karzinogenen Eigenschaften verantwortlich ist, kann nicht definitiv gesagt werden, ob die während der Resorption des NBzMA durch den Dünndarm stattfindenden Metabolisierungsreaktionen zu einer Detoxifizierung des NBzMA führen, oder ob es hierdurch gar zu einer Giftung kommt.

6. Zusammenfassung

1. N-Nitroso-benzylmethylamin tritt durch das perfundierte Rattenjejunum von der mucosalen zur serosalen Seite. NBzMA wird beim Durchtritt durch die Darmwand nicht angereichert; die serosale Konzentration beträgt am Perfusionsende 90 - 100 % der mucosalen Konzentration.
2. NBzMA hat in Konzentrationen von 0,3 bis 500 $\mu\text{mol/l}$ keine toxischen Effekte auf die gemessenen physiologischen Darmfunktionen.
3. Durch Jejunumsegmente nicht vorbehandelter Ratten wird 1 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA in geringem Ausmaß durch alpha-Oxidation metabolisiert. Dabei werden auf der serosalen Seite 4,3 % und auf der mucosalen Seite 2,7 % der eingesetzten Radioaktivitätsmenge als Metaboliten gefunden.
4. Durch Vorbehandlung der Ratten mit Weizenkeimöl und mit Phenobarbital kann der Metabolismus von NBzMA gesteigert werden. Dabei wird der Metabolitenanteil an der Gesamtradioaktivität nach zwei Stunden Perfusionsdauer durch Öl auf das Vierfache und durch Phenobarbital auf das Achtfache der bei nicht vorbehandelten Ratten gemessenen Metabolitenmenge gesteigert.
5. Durch Gabe von 3-Methylcholanthren wird keine Induktion des NBzMA-Stoffwechsels erzielt. Durch Hemmung des Cytochrom P 450 durch den Zusatz von 1 mM SK&F 525 A zum Perfusionsmedium wird der durch Phenobarbital erzielte Induktionseffekt aufgehoben.
6. Der bei Phenobarbital-induzierten Ratten gemessene NBzMA-Metabolismus steigt mit steigenden Substratkonzentrationen an, von 0,12 nmol/cm/h bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA auf 45 nmol/cm/h bei 500 $\mu\text{mol/l}$ NBzMA. Eine maximale Umsatzgeschwindigkeit ist nicht erkennbar.

7. Bei allen Konzentrationen werden die gebildeten Metaboliten auf der serosalen Seite konzentriert. Diese Konzentrierung ist bei niedrigen Substanzkonzentrationen am stärksten.
8. Unter den Metaboliten sind CO₂ und Formaldehyd nachgewiesen. Unter den nicht flüchtigen Metaboliten ist ein Glukuronsäure-konjugat einer flüchtigen Substanz identifiziert. Die Struktur von 50 % der gebildeten Metaboliten ist noch unbekannt.
9. Bei der Perfusion von Ileumsegmenten werden qualitativ gleiche Ergebnisse erhalten. Die Umsatzgeschwindigkeiten betragen 10 -20 % der für Jejunumsegmente gemessenen Werte. Durch Öl wird der Umsatz in diesen Darmsegmenten um das Achtfache gesteigert, eine weitere Steigerung durch Phenobarbital ist nicht nachweisbar. 3-Methylcholanthren und SK&F 525 A hemmen auch in Ileumsegmenten den durch Phenobarbital induzierten Metabolismus.

7 Tabellenanhang

Tabelle I

Vitalitätskriterien, bestimmt bei Perfusionen von Jejunumsegmenten weiblicher Ratten (Wasser- und Glukosetransport von der mukosalen zur serosalen Seite sowie der Serosa-Mukosa-Quotienten für Glukose und Elektrolyte)

Legende

- 1) jeweils während zwei Stunden Perfusionsdauer transportierte Substratmenge
- 2) mit erhöhter Menge Phenobarbital induzierte Ratten (120 mg/kg Körpergewicht)
- 3) Angabe von Einzelmeßwerten

Vorbehandlung, Fallzahl + NBzHA-Konzentration	Wassertransport ¹⁾ (μ l/cm Darmlänge)	Glukose transport ²⁾ (μ mol/cm Darm)	Serosa - Mukosa - Quotienten für		
			Natrium	Kalium	Calcium
keine Vorbehandlung					
1 μ mol/l NBzHA, n=4	202 $\pm$ 19 μ l	9,83 $\pm$ 0,82 μ mol	0,87 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,03
4 ml/kg Sojaöl					
0,5 μ mol/l, n=3	194 $\pm$ 25 "	5,31 $\pm$ 1,1 "	0,95 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,03
1 μ mol/l, n=4	186 $\pm$ 33 "	5,86 $\pm$ 0,4 "	0,89 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,02
3-Methylcholanthren					
1 μ mol/l, n = 5	108 $\pm$ 25 "	2,7 $\pm$ 1,0 "	0,90 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,12
Phenobarbital					
0,3 μ mol/l, n=3	225 $\pm$ 38 "	6,8 $\pm$ 0,7 "	0,88 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,10	0,70 $\pm$ 0,11
1 μ mol/l, n=5 ²⁾	207 $\pm$ 15 "	5,76 $\pm$ 0,6 "	0,91 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,09
1 μ mol/l, n=5	161 $\pm$ 15 "	5,14 $\pm$ 0,8 "	0,96 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02
3 μ mol/l, n=4	170 $\pm$ 42 "	3,22 $\pm$ 0,7 "	1,02 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,05
10 μ mol/l, n=3	150 $\pm$ 42 "	2,40 $\pm$ 0,76 "	0,90 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,13	0,56 $\pm$ 0,07
100 μ mol/l, n=2 ³⁾	170 / 201 "	5,20 / 7,80 "	0,89 / 0,89	0,75 / 0,72	0,50 / 0,32
300 μ mol/l, n=3	179 $\pm$ 12 "	5,00 $\pm$ 0,71 "	0,87 / 1,02	0,84 / 0,75	0,11 / 0,22
500 μ mol/l, n=1 ³⁾	174 "	6,80 "	0,91 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,04
Phenobarbital + 1 μ mol/l NBzHA					
1 mmol/l SK&F525A, n=5	195 $\pm$ 14 "	5,24 $\pm$ 0,61 "	0,91 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,05
0,5 mmol/l DMSO, n=3	132 $\pm$ 30 "	3,90 $\pm$ 1,3 "	0,93 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,15	0,33 $\pm$ 0,10
20 mmol/l Semicarbazid n=5	11,7 $\pm$ 3,1 "	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar 1,02 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,4	0,40 $\pm$ 0,2

Tabelle II

Vitalitätskriterien, bestimmt bei Perfusionen von Ileumsegmenten weiblicher Ratten (Wasser- und Glukosetransport von der mukosalen zur serosalen Seite sowie der Serosa-Mukosa-Quotienten für Glukose und Elektrolyte).

Legende

- 1) jeweils während 2 Stunden Perfusionsdauer transportierte Substratmenge
- 2) Angabe von Einzelmessungen
- 3) mit erhöhter Phenobarbitaldosis induziert (120 mg/kg Körpergewicht)

Vorbehandlung, Fallzahl und NBzMA-Konzentration	Wassertransport ¹⁾ ($\mu\text{l}/\text{cm Darm}$)	Glukosetransport ¹⁾ ($\mu\text{mol}/\text{cm Darm}$)	Serosa - Mukosa - Quotienten für		
			Glukose	Natrium	Kalium
					Calcium
keine Vorbehandlung					
1 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=4	118 $\pm$ 6 μl	1,01 $\pm$ 0,14 μmol	0,53 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,13
4 ml/Kg Sojaöl					0,58 $\pm$ 0,10
0,5 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=12)	64,8 "	0,45 "	0,53	1,08	0,52
1 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=12)	69,4 "	0,56 "	0,65	1,03	0,87
3-Methylcholanthren					
1 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=3	88 $\pm$ 16 "	0,27 $\pm$ 0,07 "	0,22 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,05
Phenobarbital					
0,3 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=22)	146 / 200 "	0,76 / 0,32 "	0,42 / 0,12	1,07 / 1,08	0,77 / 0,81
1 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=3)	120 $\pm$ 53 "	0,53 $\pm$ 0,21 "	0,34 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,03	0,84 $\pm$ 0,15
1 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=22)	157 / 40 "	1,48 / 0,27 "	0,92 / 0,40	1,09 / 1,16	0,71 / 0,72
3 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=12)	143 "	0,89 "	0,51	1,05	0,64
10 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=22)	134 / 337 "	0,55 / 1,4 "	0,48 / 0,50	1,12 / 1,15	0,93 / 0,91
30 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=12)	99 "	0,62 "	0,51	1,06	0,72
300 $\mu\text{mol}/\text{l}$, n=22)	72 / 167 "	0,32 / 0,63 "	0,81 / 0,28	1,01 / 1,08	0,83 / 0,70
Phenobarbital, 1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ NBzMA					
1 mmol/l SK&F525A, n=22)	103 / 88 "	0,35 / 0,61 "	0,23 / 0,55	1,03 / 1,12	0,78 / 0,68
					0,27 / 0,28

Tabelle III

Radioaktivitätsverteilung nach Perfusion von Jejunumsegmenten.
Die Bestimmung des Metabolitenanteils erfolgte mittels HPLC oder mit Bond Elut-Kartuschen.

Legende

- 1) in Prozent der insgesamt eingesetzten Radioaktivitätsmenge pro cm Darmlänge und 2 Stunden Perfusionsdauer
- 2) in nMol Metaboliten pro cm Darmlänge und Stunde Perfusionsdauer; die Werte wurden aus den Durchschnittswerten für den Metabolitenanteil in allen Fraktionen errechnet
- 3) in Prozent der insgesamt eingesetzten Radioaktivitätsmenge
- 4) Induktion mit erhöhter Phenobarbitaldosis (120 mg/kg KG)
- 5) Angabe von Einzelwerten
- 6) in der CO₂-absorbierenden Waschflasche wiedergefundene Radioaktivität

Vorbereitung, Fallzahl und MBzMA-Konzentration	Transportierte Radioaktivität	Gesamtmenge Metaboliten	Wieder- findung	Gesamtmenge CO ₂	Prozentualer Metabolitenanteil in Resorbat	Perfluorat Mucosahomogenat	Serosa - Mukosa - Quotienten für Gesamtradioaktivität MBzMA Metaboliten
Keine Vorbehandlung							
1 $\mu\text{mol/l}$, n=4	0,36 $\pm$ 0,03	0,05 nmol/ cm ² /Std.	97,6 $\pm$ 2,4	0,042 $\pm$ 0,013	4,333 $\pm$ 2,0	2,67 $\pm$ 1,2	0,92 $\pm$ 0,09
4 ml/kg Sojaöl							
0,5 $\mu\text{mol/l}$, n=3	0,25 $\pm$ 0,03	0,08	84,5 $\pm$ 1,4	0,025 $\pm$ 0,017	29,7 $\pm$ 5,2	8,4 $\pm$ 1,7	0,80 $\pm$ 0,05
1 $\mu\text{mol/l}$, n=4	0,35 $\pm$ 0,05	0,19	94,0 $\pm$ 4,0	0,062 $\pm$ 0,026	25,6 $\pm$ 4,7	10,6 $\pm$ 2,1	0,81 $\pm$ 0,05
3-Methylcholanthren							
1 $\mu\text{mol/l}$, n=5	0,17 $\pm$ 0,04	0,035	96,4 $\pm$ 3,8	0,007 $\pm$ 0,002	16 $\pm$ 2,2	1,13 $\pm$ 0,5	0,83 $\pm$ 0,04
Phenobarbital							
0,3 $\mu\text{mol/l}$, n=3	0,43 $\pm$ 0,03	0,12	104 $\pm$ 8	0,15 $\pm$ 0,03	44,6 $\pm$ 3,2	21,6 $\pm$ 2,9	0,89 $\pm$ 0,06
1 $\mu\text{mol/l}$, n=5	0,25 $\pm$ 0,03	0,287	90 $\pm$ 1,2	0,49 $\pm$ 0,13	43,0 $\pm$ 2,0	32,3 $\pm$ 4,3	0,82 $\pm$ 0,02
3 $\mu\text{mol/l}$, n=5	0,24 $\pm$ 0,03	0,415	103,3 $\pm$ 1,2	0,55 $\pm$ 0,18	44,4 $\pm$ 3,1	36,9 $\pm$ 37,5	0,95 $\pm$ 0,05
10 $\mu\text{mol/l}$, n=4	0,22 $\pm$ 0,08	0,7	83,6 $\pm$ 2,6	0,18 $\pm$ 0,10	34,9 $\pm$ 3,0	44,2 $\pm$ 5,6	0,94 $\pm$ 0,04
30 $\mu\text{mol/l}$, n=3	0,26 $\pm$ 0,10	1,75	92,6 $\pm$ 3,0	0,11 $\pm$ 0,003	23,8 $\pm$ 5,6	48 $\pm$ 5,0	0,82 $\pm$ 0,05
100 $\mu\text{mol/l}$, n=5	0,23 $\pm$ 0,26	3,9	95,4 $\pm$ 92,2	0,038 $\pm$ 0,028	16,4 $\pm$ 16,9	15,2 $\pm$ 3,6	0,95 $\pm$ 0,05
300 $\mu\text{mol/l}$, n=2	0,21 $\pm$ 0,27	8,65	90,3 $\pm$ 96,3	0,038 $\pm$ 0,106	17,3 $\pm$ 13,1	29,5 $\pm$ 30,1	0,71 $\pm$ 0,71
300 $\mu\text{mol/l}$, n=2	0,28 $\pm$ 0,014	21	89,0 $\pm$ 4,8	0,007 $\pm$ 0,002	4,0 $\pm$ 0,5	14,1 $\pm$ 16,9	0,63 $\pm$ 0,62
300 $\mu\text{mol/l}$, n=5	0,29	4,8	107,5	0,008	3,9	9,4 $\pm$ 1,0	0,69 $\pm$ 0,05
Phenobarbital, 1 $\mu\text{mol/l}$ MBzMA							
1 nmol/ISKAF525A, n=5	0,29 $\pm$ 0,02	0,063	95,5 $\pm$ 1,5	0,013 $\pm$ 0,004	9,1 $\pm$ 2,5	7,6	0,84 $\pm$ 0,04
0,5 nmol DMSO, n=5	0,26 $\pm$ 0,05	0,25	94,1 $\pm$ 0,7	0,011 $\pm$ 0,008	29,0 $\pm$ 12	27 $\pm$ 5	0,87
20 nmol/1 Semicarbazid n=5	0,023 $\pm$ 0,07	0,125	102 $\pm$ 4,2	0,015 $\pm$ 0,008	nicht bestimm- bar	nicht bestimm- bar	0,77 $\pm$ 0,02
							0,69 $\pm$ 0,20
							1,00 $\pm$ 0,16
							nicht bestimmbar
							2,64 $\pm$ 0,02
							1,92 $\pm$ 0,5

Tabelle IV

Radioaktivitätsverteilung nach Perfusion von Ileumsegmenten.
Die Bestimmung des Metabolitenanteils erfolgte mittels HPLC oder
mit Bond Elut-Kartuschen.

Legende

- 1) in Prozent der insgesamt eingesetzten Radioaktivitätsmenge pro
cm Darmlänge und Stunde Perfusionsdauer
- 2) in nmol Metaboliten pro cm Darmlänge und 2 Stunden Perfusions-
dauer; die Werte wurden aus den Durchschnittswerten für den
Metabolitenanteil in allen Fraktionen errechnet
- 3) in Prozent der insgesamt eingesetzten Radioaktivitätsmenge
- 4) Induktion mit erhöhter Phenobarbitaldosis (120 mg/kg KG)
- 5) Angabe von Einzelwerten
- 6) in der CO₂-absorbierenden Waschflasche wiedergefundene Radioakti-
vität

Vorbehandlung, Fallzahl und WBMA-Konzentration	Transportierte Radioaktivität ¹⁾	Gesamtmenge Wieder- findung ³⁾	Gesamtmenge ⁶⁾ CO ₂	Prozentualer Metabolitenanteil im Resorbat	Perfluorat	Mucosahomogenat Gesamtradioaktivität	Serosa - Mukosa - Quotienten für Metaboliten	
							MBA	Metaboliten
keine Vorbehandlung								
1 /μmol/l, n=4	0.20 ± 0.07	98.0 ± 3.6	0.002 ± 0.007	0.25	0.36	nicht bestimmt	0.91 ± 0.05	0.31 - 2.6
4 ml/kg Sojaöl								
0.5 /μmol/l, n=5	0.103	93.6	< 0.002	4.2	1.08	12.5	0.81	3.24
1 /μmol/l, n=5	0.16	104	0.004	5.12	2.75	18.9	0.95	1.84
3-Methylcholanthren								
1 /μmol/l, n=3	0.18 ± 0.01	95.8 ± 3.4	0.002 ± 0.001	1.4 ± 0.8	0.5 ± 0.2	15.1 ± 2.8	0.91 ± 0.03	2.53 - 2.88
Phenobarbital								
0.3 /μmol/l, n=25	0.29 / 0.41	102.5 / 92	0.007 / 0.026	10.7 / 7.4	3.6 / 3.8	20 / 19.5	0.81 / 1.01	2.6 / 2.1
1 /μmol/l, n=3	0.29 ± 0.08	93 ± 2.3	0.002 ± 0.008	2.2 ± 0.9	2.3 ± 0.5	nicht bestimmt	0.95 ± 0.03	1.24 ± 0.38
1 /μmol/l, n=25	0.28 / 0.05	91.6 / 83.7	0.020 / 0.001	3.6 / 14.1	2.7 / 3.1	24.6 / 20.6	0.88 / 1.00	5.0 / 1.16
3 /μmol/l, n=3	0.224	87.3	0.017	6.5	1.9	18	0.90	3.33
10 /μmol/l, n=25	0.40 / 0.23	93.7 / 91.4	0.002 / 0.003	2.4 / 5.7	1.4 / 1.4	10.1 / 12.3	1.00 / 0.90	0.40 / 3.8
30 /μmol/l, n=3	0.16	92.6	< 0.002	2.3	0.98	10.6	0.95	2.2
300 /μmol/l, n=25	0.14 / 0.27	86.6 / 92.8	0.005 / 0.004	1.7 / 1.0	1.0 / 0.98	5.6 / 9.3	0.90 / 1.05	1.5 / 1.10
Phenobarbital, 1 /μmol/l MBMA								
1 μmol/15Kt525A, n=5	0.18 / 0.17	93.8 / 93	0.000 / 0.000	3.1 / 3.1	2.0 / 1.8	nicht bestimmt	0.95 / 1.01	1.5 / 1.7

8. LITERATUR

- 1) Adams, D.J., Seilman, S., Amelizad, Z., Oesch, F. und Wolf, C.R.: Identification of human cytochrome P 450 analogous to forms induced by phenobarbital and 3-methylcholantrene in the rat, in: Biochem. J. 232 (1985), S. 869 - 876
- 2) Appel, K.E., Rühl, C.S., Spiegelhalder, B. und Hildebrand, A.G.: Denitrosation of Diphenylnitrosamine in vivo, in: Toxicology letters 23 (1984), S. 353 - 358
- 3) Baxter, P.J. und McDowall, M.E.: Occupation and cancer in London: an investigation into nasal and bladder cancer using the cancer atlas, in: Brit. J. Industrial Medicine 43 (1986), S. 44 - 49
- 4) Bellander, T., Österdahl, B.-G. und Hagmar, L.: Formation of N-nitrosopiperazine in the stomach and its excretion in the urine after oral intake of piperazine, in: Toxicol. and Appl. Pharmacol. 80 (1985), S. 193 - 198
- 5) Bonkovsky H.L., Hauri, H.-P., Marti, U., Gasser, R. und Meyer, U.A.: Cytochrom P 450 of small intestinal epithelial cells, in: Gastroenterology 88 (1985), S. 458 - 467
- 6) Borghoff, S.J. und Birnbaum, L.S.: Age-related changes in glucuronidation and deglucuronidation in liver, small intestine, lung and kidney of male fischer rats, in: Drug metab. and Disp. 13 (1985), S. 62 - 67
- 7) Bürkle, V., Wittenberg, H., Schweinsberg, F., Weissenberger, J., Schweinsberg, E. und Brückner, B.: Role of the respiratory system in metabolism of N-Nitrosamines after simultaneous application of disulfiram, in: O'Neill, J.K., v. Borstel, R.C., Miller, C.T., Long, J. und Bartsch, H., eds. N-Nitroso-

- Compounds; occurrence, biological effects and relevance to human cancer, Proc. VIII. Int. Symp. on N-Nitroso-Compounds, Banff, Canada; IARC-Monograph 57, Lyon 1984, S. 533 - 541
- 8) Cheng, S.J. und Li. M.H.: A comparative study on mutagenesis of Methylbenzyl nitrosamine in V79 cells co-cultivated with liver and esophageal epithelial cells from chicken, rats and humans, in: Carcinogenesis **6** (1985), S. 1731 - 1734
- 9) Cresteil, T., Beaune, P., Celier, C., Leroux, J.P. und Guengerich, F.P.: Cytochrome P 450 isozyme content and monooxygenase activities in rat liver. Effects of ontogenesis and pretreatment by phenobarbital and 3-methylcholanthrene, in: J. Pharmacol. and exptl. therap. **236** (1986) S. 269 - 276
- 10) Day, N.E.: Some aspects of the epidemiology of esophageal cancer, in: Cancer Res. **35** (1975), S. 3304 - 3307
- 11) Dipple, A., Michajda, C.J. und Weissburger, E.K.: Metabolism of chemical carcinogens, in: Pharmac. Ther. **27** (1985), S. 265 - 296
- 12) Domin, B.A., Philpot, R.M., Warren, B.C. and Serabjit-Singh, C.J.: Modulation of the levels of cytochrome P 450 isozymes in rabbit lung, in: Rydstrom, J., Montelius, J. und Bengtsson, M. (Hrsg.): Extrahepatic drug metabolism and chemical carcinogenesis, Elsevier BV, 1983
- 13) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. und Schmähl, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten, in: Zeitschr. f. Krebsforschung **69** (1967), S. 103 - 201
- 14) Federsel, U.: Einfluß von Fremdstoffen auf den Metabolismus von Dibutyl nitrosamin am Rattendarm, Dissertation Univ. München, 1985

- 15) Fisher, R.B. und Parsons, D.S.: A preparation of surviving rat small intestine for study of absorption , in: J. Physiol. (London) 110 (1949), S. 26 - 46
- 16) Hodgson, R.M., Wiessler, M. und Kleihues, P.: Preferential methylation of target organ DNA by the esophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine , in: Carcinogenesis 1 (1980), S. 861 - 866
- 17) Ji, C. Li, M.H., Li, J.L. und Lu, S.J.: Synthesis of nitroso-methylisoamylamine from isoamylamine and sodium nitrite by fungi, in: Carcinogenesis 7 (1986), S. 301 - 303
- 18) Kaku, M., Kusunose, E., Yamamoto, S., Ichihara, K. und Kusunose, M.: Multiple forms of cytochrome P 450 in rabbit colon microsomes, in: J. Biochem. 97 (1985), S. 663 - 670
- 19) Kleihues, P., Veit, C., Wiessler, M. und Hodgson, R.M.: DNA-methylation by N-nitrosomethylbenzylamine in target and non-target tissues of NMRI-mice, in: Carcinogenesis 2 (1981), S. 897 - 899
- 20) Koepke, S.R., Kroeger-Koepke, M.B., Tondeux, Y., Farrelly, J.G., Stewart, M. und Michajda, C.J.: α -hydroxylation of Nitrogen-15-labelled N-nitrosamines by isolated hepatocytes, in: 6, S. 437 - 442
- 21) Koster, A.S. und Noordhoek, J.: Glucuronidation in the rat intestine wall; comparison of isolated mucosal cells, latent microsomes and activated microsomes, in: Biochem. Pharmacol. 32 (1983), S. 895 - 900
- 22) Kouros, M., Mönch, W., Reiffer, F.J. und Dehnen, W.: The influence of various factors on the methylation of DNA by the esophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine. I. The importance of alcohol, in: Carcinogenesis 4 (1983), S. 1081 - 1083

- 23) Labuc, G.E. und Archer, M.C.: Esophageal and hepatic microsomal metabolism of N-Nitrosomethylbenzylamine and N-Nitrosodimethylamine in the rat, in: Cancer Res. 42 (1982), S. 3181 - 3186
- 24) Lake, B.G., Hopkins, R., Chakraborty, J., Bridges, J.W. und Parke, D.V.W.: The influence of some hepatic enzyme inducers and inhibitors by extrahepatic drug metabolism, in: Drug metabolism and Disposition 1 (1973), S. 342 - 349
- 25) Larsson, L.G., Sandström, A. und Westling, P.: Relationship of Plummer Vinson Disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden, in: Cancer Res. 35 (1975), S. 3308 - 3316
- 26) Lehmann, G., Richter, E., Schulze, J. und Zwicklenpflug, W., First-pass metabolism of N-nitrosodibutylamine (NDBA) in rat lung: comparison of in vitro with in vivo data, 10th Eur. Drug Metab. Workshop, P7/30 Guildford, UK, 6. - 11.7.1986
- 27) Li, C., Li, M.H., Li, J.L. und Lu, I.J.: Nitrosamine in 231 Nahrungsmittelproben im Lin- und Hui-Kreis, in: Chinese J. Oncology (1985) Suppl., S. 24 - 29
- 28) Lu, S.H., Ohshima, H. und Bartsch, H.: Recent studies on N-Nitroso-compounds as possible etiological factors in esophageal cancer, in: 6), S. 947 - 953
- 29) Mahu, J.L., Preaux, A.M., Mavie, P. und Berthelot, P.: Characterization of microsomal bilirubin and p-nitrophenole uridine diphosphate glucuronyltransferase activities in human liver: A comparison with rat liver, in: Enzyme 26 (1981), S. 93 - 102
- 30) Marmur, J.: A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from micro organisms, in: J. Mol. Biol. 3, S. 208 - 21

- 31) Marrett, L.D., Hartge, P. und Meigs, J.W.: Bladder cancer and occupational exposure to leather, in: Brit. J. Industrial Medicine 43 (1986), S. 96 - 100
- 32) Mehta, R., Labuc, G.E. und Archer, M.C.: Tissue and species specificity of the microsomal metabolism of N-Nitrosomethylbenzylamine, in: 6), S. 473 - 478
- 33) Merrick, B.A. und Selkirk, J.K.: Hplc of benzo(a)pyrene glucuronide, sulfate and glutathione conjugates and water soluble metabolites from hamster embryo fibroblasts, in: Carcinogenesis 6 (1985), S. 1303 - 1307
- 34) Miller, A.B., Choi, B.C.K., Howe, G.R., Burch, J.D. and Sherman, G.J.: Epidemiological assessment of risk to humans from exposure to nitrosamines, in: 6), S. 929 - 935
- 35) Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, in: Biochemistry 55 (1953), S. 416 - 421
- 36) Neiss, J.: Hemmung des intestinalen Metabolismus von Dibutyl-nitrosamin durch Ethanol bei der Ratte, Dissertation, Universität München 1985
- 37) Netter, K.J.: Inhibition of oxidative drug metabolism in microsomes, in: Parmaol. therap. 10 (1982), S. 515 - 535
- 38) Nishie, K., Norred, N.P., Wasserman, A. und Keyl, A.C.: Phototoxicity and differential hepatotoxicity as biological indicators of nitrosamine activity, in: Toxicol. and appl. pharmacol. 23 (1972), S. 680 - 691
- 39) Okada, M. und Ishidate, M.: Metabolic fate of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and its analogues. Selective induction of urinary bladder tumors in the rat, in: Xenobiotica 7 (1977), S. 11 - 24

- 40) Pang, K.S. und Gillette, J.R.: A theoretical examination of the effects of gut wall metabolism, hepatic elimination and enterohepatic recycling on estimates of bioavailability and of hepatic blood flow, in: J. Pharmacokin. and Biopharmacol. 6 (1978), S. 355 - 367
- 41) Pacifici, G.M., Bencini, C. und Rane, A.: Presystemic glucuronidation of morphine in humans and rhesus monkeys; subcellular distribution of the UDP-glucuronyl transferase in the liver and intestine, in: Xenobiotica 16 (1986), S. 123 - 128
- 42) Parsons, D.S.: Salt and water absorption by the intestinal tract, in: Br. med. Bull. 23 (1967), S. 252 - 257
- 43) Pond, S.M. und Tozer, T.N.: First pass elimination: basic concepts and clinical consequences, in: Clin. Pharmacokin. 9 (1984), S. 1 - 25
- 44) Preussmann, R.: Occurrence and exposure to N-nitroso compounds and precursors, in: 6), S. 3 - 15
- 45) Preussmann, R und Stewart, B.W.: N-nitroso carcinogens, in: Searle, C.E. (ed.): Chemical Carcinogens, ACS Chem. Soc. Monographs 182, Washington 1984, S. 683 - 828
- 46) Remmer, H.: Die Biotransformation und ihre Beeinflussung durch Barbiturate, in: Z. f. Gastroenterologie 15 (1977), S. 362 - 372
- 47) Richter, E.: Untersuchungen über den Nitrosaminstoffwechsel am Dünndarm der Ratte, Habilitationsschrift, Universität München 1986
- 48) Richter, E., Richter-Cooberg, U., Feng, X., Schulze, J. und Wiessler, M.: Intestinal metabolism of nitrosamines. I. Transport and metabolism of six nitrosamines in isolated perfused rat small intestine segments, in: Carcinogenesis 7 (1986), S. 1207 - 1213

- 49) Richter, E., Schulze, J. und Zwickelpflug, W.: Extrahepatic microsomal metabolism of N-nitrosodibutylamine in rats 9th Int. Meeting on N-Nitroso Compounds: Relevance to Human Cancer, P10 Baden bei Wien, Österreich, 1. - 5.9.1986 (1986)
- 50) Richter, E. und Strugala, G.J.: An all glass perfusator for investigation of the intestinal transport and metabolism of foreign compounds in vitro, in: J. Pharmacol. Meth. 14 (1985), S. 297 - 304
- 51) Richter-Cooberg, U.: Resorption und Metabolismus von Dialkyl-nitrosaminen am Rattendarm in vitro, Dissertation, Universität München 1984
- 52) Sander, J. und Schweinsberg, F.: Tumor-Induktion bei Mäusen durch N-Nitrosobenzylmethylamin in niedriger Dosierung, in: Zeitschr. f. Krebsforschung und klin. Onkologie 79 (1973), S. 157 - 161
- 53) Scharf, R. und Ulrich, V.: In vitro induction by phenobarbital of drug monooxygenase activity in mouse isolated small intestine, in: Biochem. Pharmacol. 23 (1974), S. 2127 - 2137
- 54) Schrager, T.F., Busby, W.F.jr., Goldman, M.E. und Newberne, P.M.: Enhancement of Methylbenzylnitrosamine-induced esophageal carcinogenesis in zinc-deficient rats: effects on incorporation of (³H)thymidine into DNA of esophageal epithelium and liver, in: Carcinogenesis 7 (1986), S. 1121 - 1126
- 55) Schweinsberg, F., Weissenberger, I., Brückner, B., Schweinsberg, E., Bürkle, V., Wittenberg, H. und Reinecke, H.-J.: Effects of disulfiram on N-nitrosomethylbenzylamine: metabolism, biochemical aspects, in: 6), S. 525 - 532
- 56) Seebach, D. und Enders, D.: Umpolung der Reaktivität von Aminen; Nucleophile α-sekundäre Aminoacylierung über metallierte Nitrosamine, in: Angew. Chemie 87 (1975), S. 1 - 18

- 57) Stevens, J., Hayden, P und Taylor, G.: The role of glutathione conjugate metabolism and cycteine conjugate-beta-lyase in the mechanism of s-cysteine conjugate toxicity in LLC-PK1-cells, in: J. Biol. Chem. 261 (1986), S. 3325 - 3332
- 58) Strugala, G.J.: Vergleichende Untersuchungen verschiedener Szintillationsflüssigkeiten und Gewebelöser, in: GIT Fachz. Lab. 28, (1984), S. 1022 - 1025
- 59) Waxman, D.J. und Walsh, C.: Phenobarbital-induced rat liver cytochrome P 450, in: J. Biol. Chem. 257 (1982), S. 10446 - 10457
- 60) Wiestler, O.D., Uozumi, A und Kleihues, P.: DNA-methylation by N-nitrosomethylbenzylamine in target and non-target tissues of laboratory rodents. Comparison with Carcinogenity, in: 6), S. 595 - 601
- 61) Wolf, C.R., Moll, E., Friedberg, T., Oesch, F., Buchmann, A., Kuhlmann, W.D. und Kunz, H.W.: Characterization, localization and regulation of a novel phenobarbital-induced form of cytochrom P 450, compared with 3 further P 450 isozymes, NADPH-cytochrome P 450-reductase, glutathione transferase and microsomal epoxide hydrolase, in: Carcinogenesis 5 (1984), S. 993- 1001

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. W. Forth danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Förderung dieser Arbeit. Für die Überlassung des Themas und für die Hilfe bei der Versuchsplanung möchte ich mich bei Herrn Dr. Richter sehr bedanken.

Herrn Dr. Strugala bin ich für viele anregende Diskussionen und Hinweise zu Dank verpflichtet.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei Frau M. Jourdan und allen Mitarbeitern des Arbeitskreises bedanken, die mir bei der Durchführung der Perfusionsversuche sehr geholfen haben.

Lebenslauf

Name: Johannes Bernhard Schulze
Geburtstag: 22.12.1955
Geburtsort: Alfhausen, Kreis Osnabrück, Niedersachsen
Familienstand: verheiratet

1962 - 1966	Volksschule Rieste
1966 - 1974	Gymnasium Antonianum, Vechta
1974	Abitur
1975 - 1976	Ableistung des Grundwehrdienstes
1976 - 1981	Studium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
1980 - 1981	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für klinische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Mai 1981	Ablegung des Diplomchemiker-Hauptexamens
1981 - 1987	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
April 1983	Ablegung der Vorprüfung im Fach Humanmedizin
April 1984	1. Teil des medizinischen Staatsexamens
April 1986	2. Teil des medizinischen Staatsexamens
April/Mai 1987	3. Teil des medizinischen Staatsexamens

